



JC971 U.S. PTO .  
09/835371  
04/17/01

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 19 135.5

**Anmeldetag:** 18. April 2000

**Anmelder/Inhaber:** Aventis Pharma Deutschland GmbH,  
Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Polyamidnukleinsäure-Derivate, Mittel und Verfahren  
zu ihrer Herstellung

**IPC:** C 07 K, A 61 K, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 29. November 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Ebert

## Polyamidnukleinsäure-Derivate, Mittel und Verfahren zur ihrer Herstellung

5

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf carboxyterminal und carboxy-/aminoterminal phosphorylierte Polyamidnukleinsäure-(PNA)-Derivate mit verbesserten Eigenschaften, deren Verwendung, sowie Mittel und Verfahren zu ihrer Herstellung.

10

Polyamidnukleinsäuren, auch Peptidnukleinsäuren (PNA) genannt, binden mit höherer Affinität als natürliche Oligonucleotide an komplementäre Zielsequenzen (DNA oder RNA) und haben gegenüber natürlicher DNA zudem den Vorteil, daß sie im Serum sehr stabil sind. PNA waren ursprünglich

15 beschrieben als unnatürliche Nukleinsäure-Analoga, in denen das gesamte Zucker-Phosphat-Rückgrat durch N-(2-Aminoethyl)-glycin-Einheiten ersetzt ist (M. Egholm et al. (1991) Science 254, 1497-1500; WO 92/20702; M. Egholm et al. Nature (1993) 365, 566-568; P. Nielsen, (1994) Bioconjugate Chem. 5, 3-7; E. Uhlmann et al. (1998) Angewandte Chemie Int. Ed. Engl. 37, 2796-2823). Als

20 Basen werden die in der Nucleotidchemie üblichen natürlich vorkommenden oder auch nicht natürlich vorkommenden Nucleobasen oder deren Prodrugformen benutzt, also Vorstufen, die erst im Organismus durch Biotransformation in die freie Base überführt werden. Darüberhinaus wurden PNAs beschrieben, in denen nicht alle Positionen des Rückgrates Basenreste

25 tragen (Greiner et al. (1999) Helv. Chim. Acta 82, 2151), und in denen Aminoethyl-glycin durch komplexere Einheiten ersetzt ist (Uhlmann et al. (1998) Angewandte Chem. Int. Ed. 37, 2796; Falkiewicz (1999) Biochim. Pol., 46, 509-529).

Der ladungsneutrale Charakter des PNA-Rückgrats ist ein wichtiges Merkmal

30 dieser Substanzklasse mit weitreichenden Konsequenzen. Es wird dem neutralen Charakter der PNA und der damit verbundenen verringerten Ladungsabstossung zugeschrieben, dass PNA selbst bei niedriger Salzkonzentration an komplementäre DNA und RNA bindet (z.B. Peptide

Nucleic Acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen und Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999, 3), wobei die Watson-Crick-Basenpaarungsregeln befolgt werden. Daher kann PNA im Prinzip für zahlreiche Anwendungen herangezogen werden, in denen sonst natürliche Oligonucleotide bzw. Oligonucleotid-Derivate eingesetzt werden. Darüber hinaus ergeben sich aber aufgrund der einzigartigen Bindungseigenschaften auch zahlreiche Anwendungen, die mit natürlichen Oligonucleotiden nicht möglich sind (siehe zum Beispiel: Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen und Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999). Beispielsweise ist mit PNA eine Stranginvasion an doppelsträngiger DNA beobachtet worden.

Typische Beispiele zur Anwendung von PNA beinhalten deren Verwendung zur Inhibition der Genexpression durch sequenzspezifische Bindung an die zelluläre DNA oder RNA. „Antisense-Agenzien“ sind kurze einzelsträngige Nukleinsäure-Derivate, die über Watson-Crick Basenpaarung an eine komplementäre mRNA binden, deren Übersetzung in das entsprechende Protein gehemmt werden soll (Uhlmann und Peyman (1990) Chem. Rev. 90, 543; Larsen et al. (1999) Biochem. Biophys. Acta 1489, 159). "Anti-Gen-Agenzien" binden über Hoogsteen-Basenpaarung in die große Furche der DNA-Doppelhelix unter Ausbildung einer Tripelhelix, wodurch die Transkription der Gene sequenzspezifisch gehemmt wird (Praseuth et al. (1999) Biochem. Biophys. Acta 1489, 181). Die Genexpression kann auch durch sogenannte "Decoy"-Oligomere, die die Bindungsregionen für Transkriptionsfaktoren nachahmen, spezifisch gehemmt werden. Durch die Behandlung mit Decoy-Agenzien lassen sich bestimmte Transkriptionsfaktoren sequenzspezifisch abfangen und dadurch eine Aktivierung der Transkription verhindern (Mischianti et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 33114). Eine weitere Gruppe von intrazellulär wirkenden Oligonucleotid-Derivaten, die Chimeraplasten, werden zur gezielten Genkorrektur herangezogen (Cole-Strauss et al. (1996) Science 273, 1386-1389).

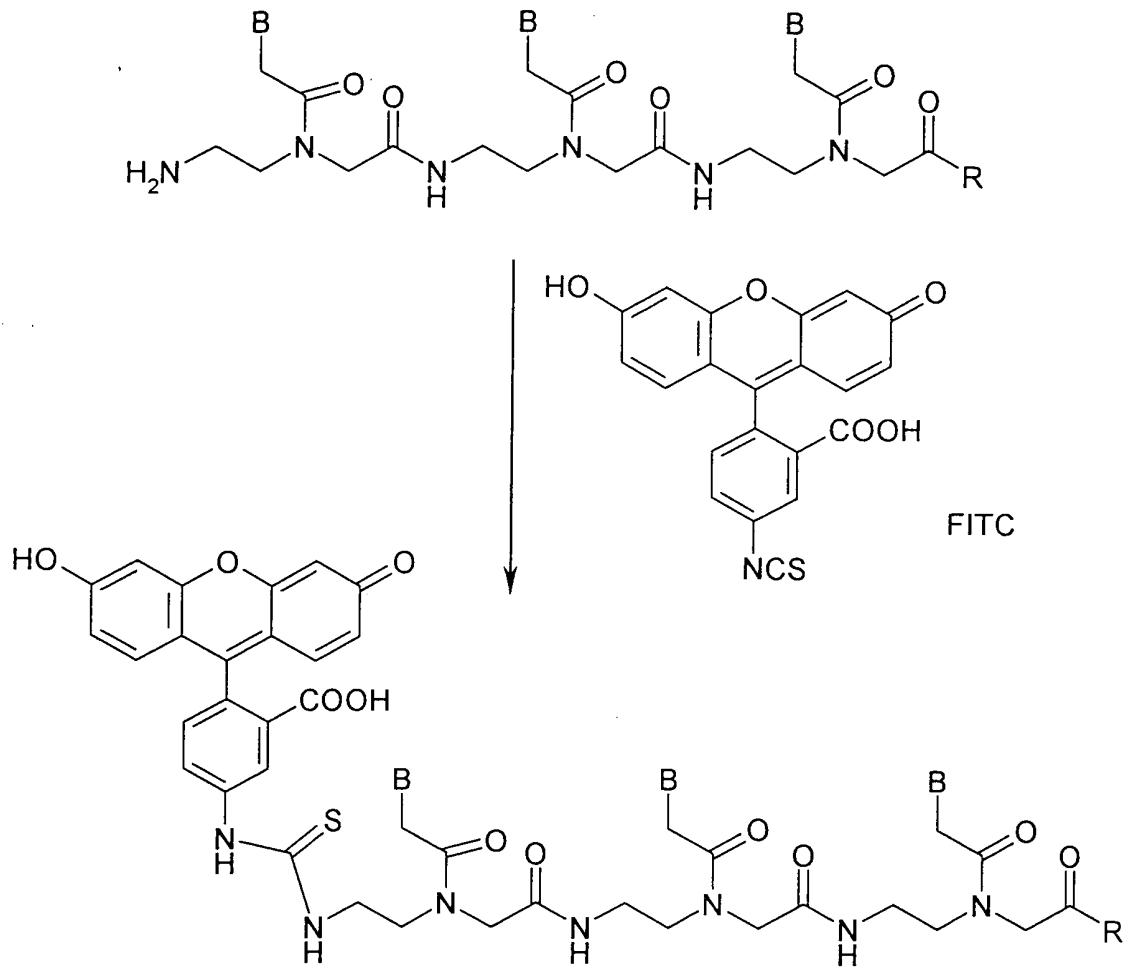
PNA können daher als Arzneimittel und/oder Diagnostikum bzw. zur Herstellung von Arzneimitteln und/oder Diagnostika verwendet werden.

Für diagnostische Zwecke und in der Molekularbiologie kann PNA

5 beispielsweise nach Markierung mit Biotin, Fluorescein oder anderen Labeln als spezifische Hybridisierungs-sonde eingesetzt werden. Für die Einführung der Markergruppen sind in der Literatur bislang vier Methoden beschrieben (Oerum et al. (1999), in *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications*, Seiten 81-86; Lohse et al. (1997) *Bioconjugate Chem.* 8, 503). Die erste Methode beruht  
10 auf der Markierung der freien (entschützten) PNA nach deren Synthese in Lösung. Dabei wird der Aminoterminus der PNA mit einer aktivierten Carbonsäure oder einem Isothiocyanat umgesetzt. Oft werden aber zusätzliche Lysin-Reste in die PNA eingeführt, die dann mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) umgesetzt werden.

15

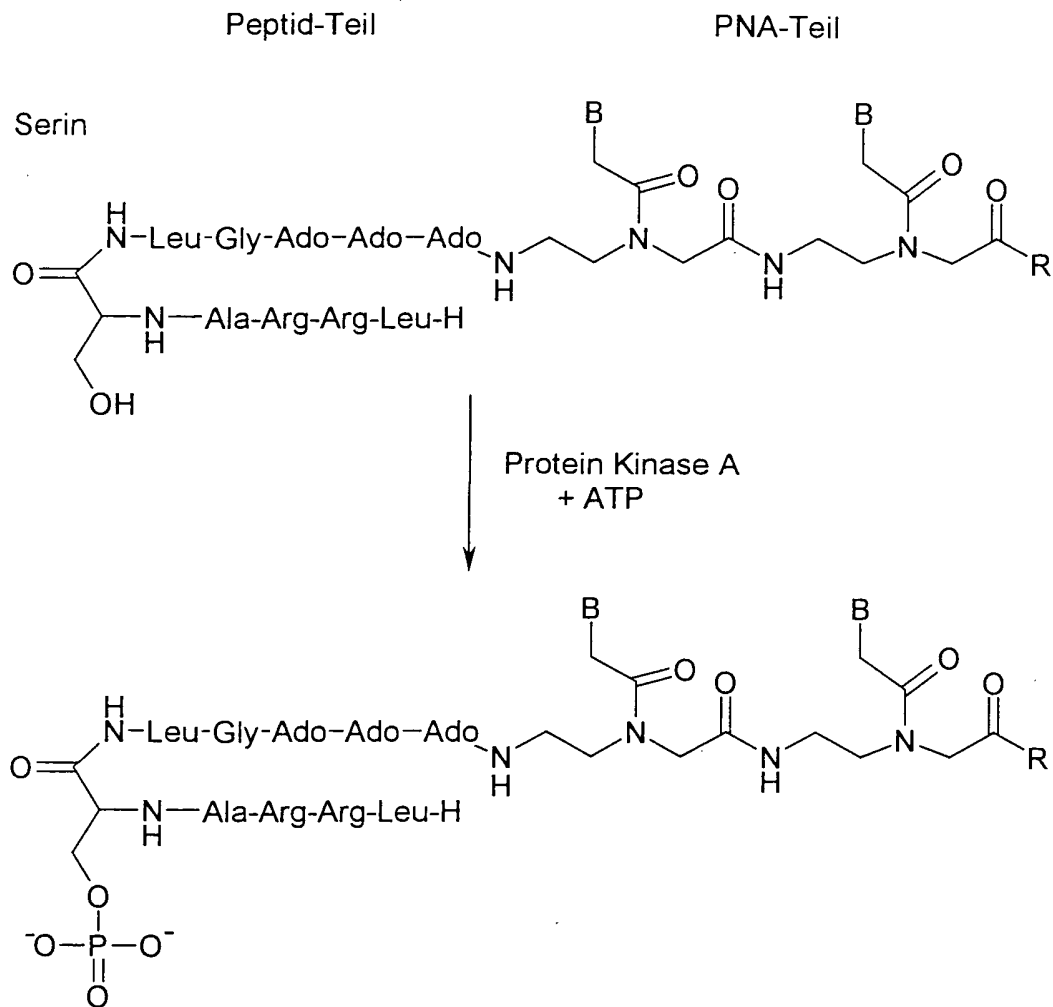
Bei der zweiten Methode wird die geschützte PNA noch an der Festphase am Aminoterminus mit aktivierten Carbonsäure-Derivaten oder Isothiocyanaten modifiziert. Diese Methode eignet sich nur für Markergruppen, die unter den Bedingungen der Entschützung der PNA und während der Abspaltung vom  
20 Träger stabil sind. Als reaktive Reagenzien werden in beiden Fällen bevorzugt Isothiocyanate (P. Wittung et al., (1995) *FEBS Lett.* 375, 27) oder aktivierte Carbonsäuren, wie beispielsweise N-Hydroxysuccinimidester (NHS), eingesetzt (Oerum et al., 1999). Ein Nachteil der Reaktion mit den NHS-Derivaten ist, dass sie oft nur in schlechten Ausbeuten gelingt. Daher wird häufig 8-Amino-  
25 3,6-dioxaoctansäure als Linker bzw. Spacer zwischen PNA und Markergruppe kondensiert (Oerum et al., 1999). Beide Verknüpfungen erfolgen über Amidbindungen bzw. Thioharnstoffbindungen, die als solche aber eher zu Unlöslichkeit führen. Alternativ werden die Carbonsäuren mit Hilfe von in der Peptid-Chemie üblichen Aktivatoren, wie beispielsweise HBTU, TBTU oder  
30 HATU zur Reaktion gebracht.



Bei einer dritten Methode werden Fluorescein-konjugierte Monomere bei der Festphasensynthese von PNA verwendet, wobei die Fluoreszenz-Markierung über eine Amidbindung erfolgt (Lohse et al. (1997) Bioconjugate Chem. 8, 503), die wiederum zu relativ schwerlöslichen Konjugaten führt.

Eine vierte Methode verwendet PNA-Peptid-Konjugate, in denen der Peptid-Teil ein Substrat für eine Protein-Kinase bildet (Koch et al. (1995) Tetrahedron Lett. 36, 6933). Auf diese Weise wird also nicht der PNA-Teil modifiziert, sondern der Serin-Rest des Peptid-Segments wird enzymatisch phosphoryliert. Mit dieser Methode kann also nur radioaktives Phosphat, aber beispielsweise kein

Fluorescein oder Biotin in das Peptid-Segment des PNA-Peptid-Konjugats eingeführt werden.



5

Es ist bekannt, dass PNA in wässriger Lösung, also auch unter physiologischen Bedingungen, zur Aggregation neigt. PNA ist daher in wässrigem Puffer schlecht löslich und steht dann nicht für die Hybridisierung an komplementäre Sequenzen zur Verfügung. PNA zeigt zudem eine hohe Affinität zu verschiedenen Materialien wie ®Sephadex (Fa. Pharmacia), ®Bond Elut (Fa. Varian), oder verschiedene HPLC-Chromatographiematerialien, die bei der Aufreinigung der Oligomeren Verwendung finden, so daß die PNA oft nur in schlechten Ausbeuten zu isolieren ist. Daher ist es notwendig, die PNA mit

Lysin oder anderen positiv geladenen Aminosäuren (über den C-Terminus) zu konjugieren (Egholm et al (1992) J. Am. Chem. Soc. 114, 1895). Guaninreiche PNA-Sequenzen tendieren ganz besonders zur Aggregation, weshalb von der Verwendung solcher PNA abgeraten wird (siehe "Guidelines for sequence  
 5 design of PNA oligomers" in Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications (1999) Seiten 253-255). Besonders schwerlöslich sind beispielsweise längere Fluorescein-markierte PNA-Oligomere, wobei die Zugabe eines organischen Lösemittels und Erwärmen auf 50°C empfohlen wird.

10 Die Reinigung der schwerlöslichen lipophilen PNA-Derivate ist besonders schwierig. Bei der HPLC werden oft mehrere Peaks detektiert, die auf PNA-Aggregate zurückzuführen sind. Die für die Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren häufig angewandte Technik der Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese ist für diese PNA-Derivate nicht möglich.

15

Bei den oben beschriebenen Methoden der Derivatisierung von PNA wird die Marker-Gruppe stets durch Knüpfung einer Amidbindung oder Thioamidbindung eingeführt, wobei relativ schwerlösliche PNA-Derivate gebildet werden.

Insbesondere bei der Einführung lipophiler Reste, wie beispielsweise des  
 20 Fluoresceins, entstehen schwerlösliche PNA-Derivate. Die Einführung von Markern an beiden Enden der PNA ist technisch noch schwieriger und führt im allgemeinen zu einer noch schlechteren Löslichkeit. Ausserdem sind keine effiziente Methoden für eine gleichzeitige amino- und carboxyterminale

Derivatisierung von PNA, insbesondere durch Festphasensynthese  
 25 beschrieben. Da die Markierungs-Reaktionen zudem oft in schlechten Ausbeuten verlaufen, besteht eine zu lösende Aufgabe darin, neue PNA-Derivate bereitzustellen, welche in hohen Ausbeuten herzustellen sein sollen und vorteilhaften Eigenschaften aufweisen, wie verbesserter Löslichkeit, verbessertem Bindungsverhalten, besserer zellulärer Aufnahme aufweisen  
 30 sollen, und die zudem den Einsatz effektiver Reinigungsmethoden für die PNA-Oligomeren erlaubt.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Bereitstellung von PNA-Derivaten, die am C-Terminus oder am C- und N-Terminus des PNA-Rückgrates einen oder mehrere Phosphoryl-Reste tragen, wobei neben Oxo- auch Thio- und Imino-Phosphorylreste umfasst sind, und wobei mindestens

5 einer der Phosphoryl-Reste eine oder mehrere deprotonierbare Gruppen, vorzugsweise Hydroxy- oder Mercapto-Gruppen trägt. Die Phosphoryl-Reste sind über eine Sauerstoff-Phosphor, Schwefel-Phosphor oder eine Stickstoff-Phosphor-Bindung entweder direkt oder über einen Spacer mit dem PNA-Rückgrat verknüpft, wobei der Spacer beispielsweise ein Alkanoylamid, ein

10 Poly(alkoxy)carboxamid oder eine Aminosäure sein kann. Beispiele für Phosphoryl-Reste sind Phosphat, Phosphonat, Thiophosphat, Phosphoamidat oder substituierte Phosphoryl-Reste, wobei substituierte Phosphoryl-Reste gegebenenfalls eine oder mehrere Markergruppen, oder Gruppen zur Quervernetzung, oder Gruppen, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen,

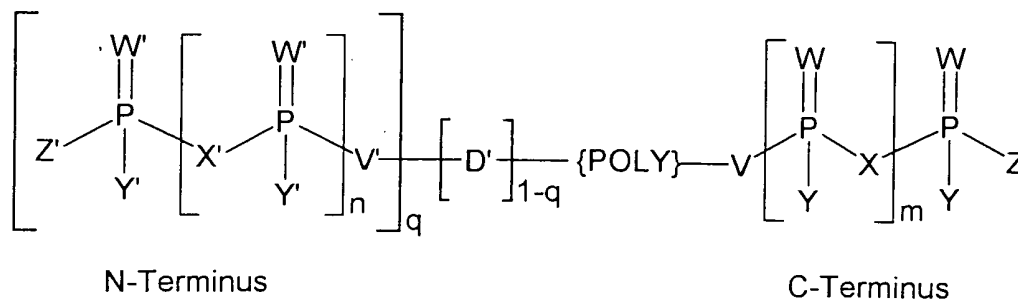
15 oder Gruppen, die die Bindungsaffinität des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigern, tragen.

Unter Markergruppen (Labeln) versteht man dabei Gruppen, die eine qualitative oder quantitative Bewertung der chemischen oder biologischen Aktivität der

20 PNA-Derivate erlauben, beispielsweise Biotin oder Fluoreszein. Unter Quervernetzung (Cross-Linking) versteht man die Ausbildung intra- bzw. intermolekularer Bindungen zwischen räumlich benachbarten Funktionalitäten. Eine Gruppe zur Quervernetzung ist beispielsweise die Psoralengruppe.

25 Erfindung betrifft vorzugsweise PNA-Derivate der Formel I





Formel I

wobei

q gleich 0 oder 1 ist,

D' gleich Hydroxy, Mercapto, Amino, Alkylamino oder Acylamino, vorzugsweise Acetylamino, ist,

V unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel, NR<sub>1</sub> ist,

V' unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel, NR<sub>1</sub>, eine Gruppe U-(CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>U'</sub>-C(O)-NH oder eine Gruppe U-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>U'</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH ist,

U unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel oder NH ist,

u' unabhängig voneinander gleich 1 bis 10 ist, vorzugsweise 1 bis 4, besonders bevorzugt 1,

W und W' unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel oder NR<sub>1</sub> sind,

Y und Y' unabhängig voneinander gleich Hydroxy, Mercapto, Oxyanion, Thioat oder NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> sind,

- X und X' unabhängig voneinander gleich eine Gruppe  $U-(C_2-C_{22}-$   
 AlkandiyI)-U oder eine Gruppe  $U-(CH_2CH_2-O)_u$  ist,  
 oder gleich eine Markergruppe, oder eine Gruppe zur  
 Quervernetzung, oder eine Gruppe, die die intrazelluläre  
 Aufnahme begünstigt, oder eine Gruppe, die die Bindungsaffinität  
 des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigert, ist,  
 beispielsweise ein bifunktionseller Fluorescein-, Rhodamin-,  
 TAMRA-, Biotin-, Pyren-, Dinitrophenyl-, Cholesteryl-, Acridin-,  
 Adamantyl-, Vitamin E-, Cyaninfarbstoff-, Dabcyl-, Edans-,  
 Lexitropsin-, Psoralen-, BODIPY-, ROX-, R6G- oder Digoxigenin-  
 Rest,
- Z und Z' unabhängig voneinander gleich Hydroxy, Mercapto, Oxyanion,  
 Thioat oder  $NR_1R_2$ ,  $C_1-C_{22}$ -Alkyl,  $C_1-C_8$ -Arylalkyl,  $C_1-C_{22}$ -Alkyl-  
 U,  $C_1-C_8$ -Arylalkyl-U, Hydroxy- $C_1-C_{18}$ -U, Aminoalkyl-U,  
 Mercaptoalkyl-U ist,  
 oder eine Gruppe der Formel  $R_7(CH_2CH_2-O)_m$  ist, wobei  $R_7$   
 gleich Hydroxy, Amino oder  $C_1-C_{22}$ -Alkoxy und m gleich 1 bis 100  
 ist, vorzugsweise 2 bis 10,  
 oder gleich eine Markergruppe, oder eine Gruppe zur  
 Quervernetzung, oder eine Gruppe, die die intrazelluläre  
 Aufnahme begünstigt, oder eine Gruppe, die die Bindungsaffinität  
 des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigert, ist,  
 beispielsweise ein monofunktionseller oder bifunktionseller  
 Fluorescein-, Rhodamin-, TAMRA-, Biotin-, Pyren-, Dinitrophenyl-,  
 Cholesteryl-, Acridin-, Adamantyl-, Vitamin E-, Cyaninfarbstoff-,  
 Dabcyl-, Edans-, Lexitropsin-, Psoralen-, BODIPY-, ROX-, R6G-  
 oder Digoxigenin-Rest,

$R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander ein Rest bestehend aus Wasserstoff oder  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl bedeuten, vorzugsweise Wasserstoff,

5  $R_3$  und  $R_4$  unabhängig voneinander ein Rest bestehend aus Wasserstoff oder  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl oder den Rest einer Aminosäure-Seitenkette bedeuten, vorzugsweise Wasserstoff, wobei benachbarte Reste  $R_3$  und  $R_4$  in  $V'$  auch einen  $C_5$ - $C_8$ -Cycloalkyl-Ring bilden können,

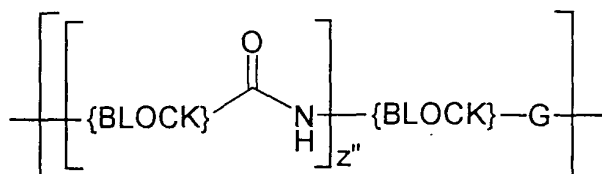
10  $n$  gleich 0 bis 10 ist, vorzugsweise 0 bis 3,

$m$  gleich 0 bis 10 ist, vorzugsweise 0 bis 3,

mit der Massgabe, dass mindestens ein Rest  $Y$ ,  $Y'$ ,  $Z$  oder  $Z'$  gleich Hydroxy, Mercapto, Oxyanion oder Thioat ist.

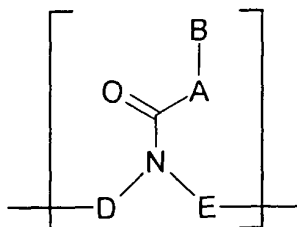
15

Die Gruppe {POLY} wird beschrieben durch die Formel II,



Formel II

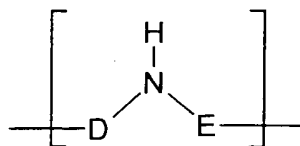
20 wobei {BLOCK} unabhängig voneinander eine Gruppe ist ausgewählt aus Formel IIIA,



Formel III A

25

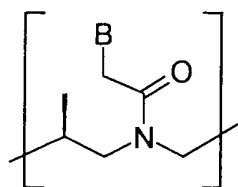
oder aus Formel IIIB (Greiner et al. (1999) Helv. Chim Acta 82, 2151),



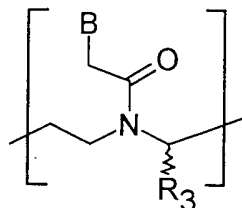
Formel III B

oder aus den Formeln IV A bis IV G (Uhlmann et al. (1998) Angewandte Chem. Int. Ed. 37, 2796; Falkiewicz (1999) Biochim. Pol., 46, 509-529),

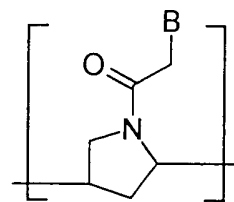
5



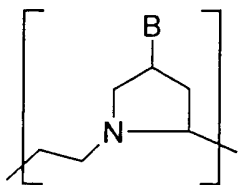
Formel IV A



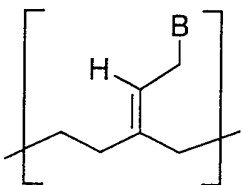
Formel IV B



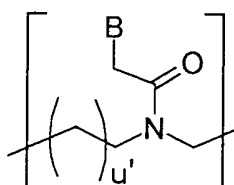
Formel IV C



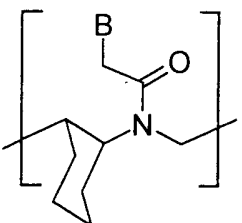
Formel IV D



Formel IV E



Formel IV F



Formel IV G

wobei jeder Baustein {BLOCK} verschieden sein kann,

und wobei ferner gilt, dass

10

z'' gleich 0 bis 100 ist, vorzugsweise 1-20, besonders bevorzugt 4-15,

- G ausgewählt wird aus den Gruppen  $(CR_5R_6)_{u'}$ ,  $C(O)NH-(CR_1R_2)_t$  oder  $C(O)NH-(CH_2CH_2O)_{u'}-CH_2CH_2$  ist, wobei  $u'$  die obige Bedeutung hat und  $t'$  gleich 2 bis 10 ist, vorzugsweise 6,
- 5 A unabhängig voneinander eine Gruppe  $(CR_1R_2)_s$  ist, wobei  $s$  gleich 1 bis 3 ist, vorzugsweise 1,
- 10 B unabhängig voneinander entweder ein aromatischer Rest, der auch heteroaromatischen Charakter besitzen kann, oder Wasserstoff, oder Hydroxy oder  $C_1$ - $C_{18}$ -Alkyl ist, oder eine in der Nucleotidchemie übliche natürlich vorkommende oder eine nicht natürlich vorkommende Nucleobase oder deren Prodrugform ist, mit der Maßgabe, dass mindestens ein Rest B eine Nucleobase ist,
- 15 D unabhängig voneinander eine Gruppe  $(CR_3R_4)_t$  ist, wobei  $t$  gleich 2 bis 10 ist, vorzugsweise 2 bis 4, besonders bevorzugt 2,
- 20 E unabhängig voneinander eine Gruppe  $(CR_5R_6)_{u'}$  ist, wobei benachbarte Reste  $R_5$  und  $R_6$  auch einen  $C_5$ - $C_8$ -Cycloalkyl-Ring oder eine Spiroverbindung bilden können,
- 25  $R_5$  und  $R_6$  unabhängig voneinander einen Rest bestehend aus Wasserstoff oder  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl oder den Rest einer Aminosäure-Seitenkette bedeuten, vorzugsweise Wasserstoff,

sowie physiologisch verträglichen Salze der PNA-Derivate der Formel I.

Physiologisch verträglichen Salze sind u.a. beschrieben in Remingtons Pharmaceutical Science (1985) Mack Publishing Company, Easton, PA, USA,

30 Seite 1418. Bevorzugt sind Ammoniumsalze, Trialkylammoniumsalze,

Alkalimetallsalze (wie Natrium- und Kaliumsalze) und Erdalkalisalze (wie Magnesium- und Calciumsalze). Besonders bevorzugt sind Natriumsalze.

- Als überraschender positiver Effekt zeigte sich, dass die Einführung eines
- 5 Phosphoryl-Restes beispielsweise als Phosphat oder auch in Form einer lipophilen Derivatisierung (z. B. als Hexadecylphosphodiester) die Affinität der PNA an komplementäre DNA oder RNA erhöht. Dieser Effekt war nicht zu erwarten, da die starke Binding von PNA an komplementäre DNA oder RNA dem neutralen Charakter der PNA und der damit verbundenen reduzierten
- 10 Ladungsabstossung zugeschrieben wurde (z.B. Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen und Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999, 3).

- Besonders effektiv erfolgte die Einführung des Biotins über einen
- 15 Phosphorylrest. Die biotinylierte PNA der Formel I (X, X', Z und/oder Z' = Biotinrest) zeigten als Hybridisierungssonden bessere Bindungseigenschaften und weniger störende unspezifische Hintergrund-Effekte als entsprechende biotinylierte DNA-Sonden.
- 20 Im Gegensatz zur ungeladenen PNA können die erfindungsgemäßen PNA-Derivate der Formel I auch im elektrischen Feld wandern, wodurch eine Mikrolokalisierung und eine Konzentrierung an immobilisierten komplementären Nukleinsäurederivaten möglich ist. Für die polyanionischen Oligonucleotide wurde diese Methode zur raschen Bestimmung von Basenmisspaarungen mit
- 25 Hilfe des elektrischen Felds bereits beschrieben (Sosnowski et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 1119).

- Die Hydroxy- bzw. Mercapto-Substituenten der Phosphoryl-Reste der erfindungsgemäßen PNA-Derivate können in einem pH-Bereich von 4,5 bis 14,
- 30 vorzugsweise 6,5 bis 12, besonders bevorzugt 6,5 bis 9 deprotoniert werden. Die Eigenschaft der Ionisierbarkeit der Phosphoryl-Reste kann vorteilhaft zur

Reinigung der Verbindungen der Formel I ausgenutzt werden. Einerseits können die Verbindungen der Formel I durch Elektrophorese, beispielsweise Polyacrylamid-Gelelektrophorese, gereinigt werden. Andererseits ist eine Reinigung mit Hilfe von Anionenaustauschern möglich. Dabei werden die

5 gewünschten Produkte bevorzugt durch Anwendung eines Salzgradienten, beispielsweise eines Kochsalz-Gradienten, oder eines pH-Gradienten eluiert. Besonders einfach und effizient lassen sich die erfindungsgemäßen PNA-Derivate der Formel I über Anionenaustauscher reinigen. Es zeigte sich, dass die ungeladenen Nebenprodukte nicht auf dem Anionenaustauscher retardiert

10 werden, während das geladene Produkt auf der Säule haftete. Nach Waschen mit Wasser konnte das gewünschte Produkt mit Essigsäure oder einer Kochsalzlösung in reiner Form isoliert werden. Als Anionenaustauscher verwendet man bevorzugt starke Anionenaustauscher, oder Mixed-Mode-Phasen, wie beispielsweise ©Oasis MAX (Waters GmbH, Eschborn).

15 Weiterhin zeigte sich, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I generell besser in wässrigem Medium löslich sind als die entsprechenden PNA-Oligomeren ohne den Phosphoryl-Rest. Dies macht sich ganz besonders bei den lipophilen Derivaten, wie beispielsweise den Fluorescein-Derivaten oder

20 Hexadecyl-Derivaten, in Form einer stark verbesserten Löslichkeit in wässrigem Medium bemerkbar.

Die Erfindung betrifft besonders PNA-Derivate, in denen A und E gleich  $\text{CH}_2$  sind. Weiterhin betrifft die Erfindung besonders PNA-Derivate, in denen D

25 gleich  $(\text{CH}_2)_2$  sind. Bevorzugt sind ferner PNA-Derivate der Formel I, in denen W und W' gleich Oxo sind, weiterhin solche, in denen Y und Y' gleich Hydroxy oder Oxyanion sind, und solche in denen V und V' gleich Oxy sind.

Beispiele für natürliche Basen sind Adenin, Cytosin, 5-Methylcytosin, Guanin,

30 Thymin und Uracil. Beispiele für unnatürliche Basen sind Purin, 2,6-

Diaminopurin,  $N^4N^4$ -Ethancytosin,  $N^6N^6$ -Ethano-2,6-diaminopurin, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-uracil, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-cytosin, 5-(1-Propargylamino)-uracil, 5-(1-Propargylamino)-cytosin, Phenoxazin, 9-Aminoethoxyphenoxazin, 5-Fluor-uracil oder Pseudoisocytosin, 5-(Hydroxymethyl)uracil, 5-Aminouracil, Pseudouracil,

5 Dihydrouracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-cytosin, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin, 7-Deazaadenin, 7-Deazaguanin, 8-Azapurin, oder 7-Deaza-7-substituierte Purine.

- 10 Für PNA-Derivate, die nur C-terminal einen Phosphoryl-Rest tragen (für die  $q$  gleich 0 ist), kann der N-Terminus mit einer Peptidsequenz verknüpft sein. Als Peptidsequenzen kommen bevorzugt solche in Betracht, die Organverteilung oder die zelluläre Lokalisierung des PNA optimieren, wie beispielsweise Transportan, Insulin-like Growth Factor, Nuclear Localisation Signale oder
- 15 andere Carriersequenzen (Larsen et al. (1999) Biochim. Biophys. Acta 159-166). Das Peptid kann auch als Affinitäts-Tag dienen, wie etwa eine (His)<sub>6</sub> Kette.

- Die vorliegende Erfindung ermöglicht eine breite Variation der Reste X, X', Z und Z' (Beispiele sind in Figuren 1a, 1b, 2a, 2b, 3a und 3b gegeben) und erlaubt so die Einführung unterschiedlicher spezifischer Funktionsmerkmale in PNA.
- 20

Eine bevorzugte Ausführungsform von Z bzw. Z' ist ein C<sub>1</sub>- bis C<sub>22</sub>-Alkyl-Rest.

- 25 Bevorzugt sind auch C<sub>1</sub>- bis C<sub>22</sub>-Alkoxy-Reste, insbesondere C<sub>16</sub>-Alkoxy-Reste. Andere bevorzugte Reste sind Hydroxy-(C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkoxy)-Reste, insbesondere HO(CH<sub>2</sub>)<sub>3-12</sub>O. Weiterhin bevorzugt sind Aminoalkoxy-Reste, insbesondere 6-Aminohexoxy- und 5-Aminopentoxy-Reste. Weiterhin bevorzugt sind Reste der Formel R<sub>7</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>m</sub>, wobei R<sub>7</sub> gleich Hydroxy, Amino oder



C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>-Alkoxy ist, bevorzugt aber Hydroxy ist, und m gleich 0 bis 100, bevorzugt 2 bis 10 ist. Besonders bevorzugt sind HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>2</sub>, HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>6</sub> und H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>2</sub>. Weitere bevorzugte Beispiele von Z bzw. Z' umfassen Mercaptoalkoxy-Reste, insbesondere 6-Mercaptohexyloxy.

5

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst Z bzw. Z' eine fluoreszierende Gruppe wie Fluorescein, Rhodamin, TAMRA oder einen Cyanin-Farbstoff. Bevorzugte fluoreszierende Gruppen sind in den Figuren 1a bis 3b zu finden. Ganz besonders bevorzugt ist auch Biotin für Z. Andere bevorzugte Gruppen für Z umfassen Dabcyl, Psoralen, Acridin, DNP und Cholesterol (Figuren 1b und 2b), BODIPY-, ROX- oder R6G-Reste (Su-Chun Hung et al. (1998) Analytical Biochemistry 255, 32-38) und Digoxigenin (Tarrason et al., Methods in Enzymology (1999) Vol. 313, 257-268).

10

15 Darüberhinaus kann Z bzw. Z' gleich einer Gruppe bestehend aus einem monofunktionellen oder einem bifunktionellen Fluorescein-, Rhodamin-, TAMRA-, Biotin-, Pyren-, Dinitrophenyl-, Cholesteryl-, Acridin-, Adamantyl-, Vitamin-E-, Cyaninfarbstoff-, Dabcyl-, Edans-, Lexitropsin-, oder Psoralen-Rest sein. Monofunktionelle Endgruppen sind beispielhaft in den Figuren 1a, 1b, 2a und 3a ausgeführt, bifunktionelle verbrückende Gruppen sind in Figuren 2b und 3b aufgeführt. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist n und/oder m unabhängig voneinander gleich 0, d.h. der PNA-Teil trägt am N- und/oder am C-Terminus jeweils nur einen Phosphoryl-Rest.

20

25 Eine bevorzugte Ausführungsform von X bzw. X' ist U-(C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>-Alkandiyl)-U, insbesondere O-(C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>-Alkandiyl)-O, besonders bevorzugt O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2-6</sub>-O. Eine andere bevorzugte Ausführungsform von X bzw. X' ist eine Gruppe der Formel U-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>u</sub>, wobei u' gleich 1 bis 10 ist, bevorzugt 1 bis 6, und wobei U bevorzugt Oxy ist. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform

umfasst X bzw. X' eine fluoreszierende Gruppe wie Fluorescein, Rhodamin, TAMRA oder einen Cyanin-Farbstoff, beispielsweise @Cy3 (Fa. Amersham Pharmacia Biotech). Bevorzugte bifunktionelle Gruppen sind in den Figuren 2a und 3a zu finden. Ganz besonders bevorzugt ist auch Biotin für X bzw. X'.

- 5   Andere bevorzugte Gruppen sind Dabcyl-, Psoralen-, Acridin-, DNP-, Cholesterol-, BODIPY-, Lexitropsin-, Digoxigenin-, ROX- und R6G-Reste.

- Die unterschiedlichen Reste für X, X', Z und Z' in Formel I können unterschiedliche Funktionen erfüllen. Die Fluorescein-Reste haben
- 10   weitreichende Anwendungen bei der DNA-Sequenzierung, Signalamplifikation oder als Marker zur Bestimmung der zellulären Aufnahme von PNA. Die Cyanin-Farbstoff-Reste (@Cy3 und @Cy5) ergeben ein wesentlich intensiveres und länger anhaltendes Fluoreszenzsignal als Fluorescein selbst. Der
- 15   Psoralen-Rest wird zur Quervernetzung (Cross-Linking) mit komplementären Nukleinsäuren eingesetzt. Der Acridin-Rest ist ein effektiver Interkalator und kann damit die Bindungsaffinität der PNA verstärken. Biotin-, Acridin- und Psoralen-Derivate können auch für Antisense-Experimente eingesetzt werden. Weiterhin können Hexadecyloxy- und Cholesterol-Derivate zur Erhöhung der
- 20   Membrangängigkeit der PNA angewandt werden. DNP-markierte Verbindungen der Formel I lassen sich mit anti-DNP-Antikörpern nachweisen. Aminoalkoxy-Reste lassen sich zur Kupplung weiterer Gruppen, wie beispielsweise
- 25   Lexitropsin (vgl. Beispiel 17; PNA-16), nutzen. In ähnlicher Weise lassen sich auch Mercaptoalkoxy-Gruppen zur weiteren Derivatisierung nutzen.

- 25   Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der PNA-Derivate der Formel I als Arzneimittel. Diese Arzneimittel können zur Prävention und/oder Behandlung von Krankheiten, die mit der Expression bzw. einer Überexpression bestimmter Gene einhergehen, eingesetzt werden. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von PNA-Derivaten als Diagnostikum.
- 30   Diese Diagnostika können zur Früherkennung der oben genannten Krankheiten eingesetzt werden.

Als Arzneimittel bzw. Diagnostikum lassen sich die PNA-Derivate der Formel I in Abhängigkeit ihrer Sequenz als Antisense-, Antigene-, Decoy-, und Chimeraplast-Agenzien nutzen.

- 5 Die erfindungsgemäßen PNA-Derivate werden insbesondere zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Krankheiten verwendet, bei denen definierte Gene durch Überexpression ursächlich bzw. beteiligt ist.

- 10 Diese Arzneimittel können beispielsweise zur Behandlung von Erkrankungen verwendet werden, die durch Viren hervorgerufen werden, beispielsweise durch CMV, HIV, HSV-1, HSV-2, Influenza, VSV, Hepatitis B oder Papilloma Viren, wobei die entsprechende Virus-Sequenz das Target ist.

- 15 Erfindungsgemäße Antisense-PNA-Derivate, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basensequenz.

a) gegen CMV, z. B.

20 SEQ ID NO. 1      5'-G C G T T T G C T C T T C T T C T T G C G-3'

b) gegen HIV, z. B.

25 SEQ ID NO. 2      5'-A C A C C C A A T T C T G A A A A T G G -3'  
SEQ ID NO. 3      5'-A G G T C C C T G T T C G G G C G C C A-3'

c) gegen HSV-1, z.B.

SEQ ID NO. 4      5'-G C G G G G C T C C A T G G G G G T C G-3'

- 30 Solche Arzneimittel eignen sich beispielsweise auch zur Behandlung von Krebs. Vorzugsweise können dabei Sequenzen zum Einsatz kommen, die

gegen Targets gerichtet sind, die für Krebsentstehung bzw. Krebswachstum verantwortlich sind, insbesondere durch die Inhibition der Telomerase (E. Matthes et al. (1999) Nucleic Acids Res. 27, 1152). Solche Targets sind weiterhin:

5

1) Nucleare Onkoproteine wie beispielsweise c-myc, N-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, PCNA, p120,

10

2) Cytoplasmische/Membran-assoziierte Onkoproteine wie beispielsweise EJ-ras, c-Ha-ras, N-ras, rrg, bcl-2, cdc-2, c-raf-1, c-mos, c-src, c-abl, c-ets,

15

3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise EGF-Rezeptor, Her-2, c-erbA, VEGF-Rezeptor (KDR-1), Retinoid-Rezeptoren, Protein-Kinase regulatorische Untereinheit, c-fms, Tie-2, c-raf-1 Kinase, PKC-alpha, Protein Kinase A (R1 alpha),

20

4) Cytokine, Wachstumsfaktoren, Extrazelluläre Matrix wie beispielsweise CSF-1, IL-6, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, bFGF, VEGF, Myeloblastin, Fibronectin.

Antisense-PNA-Derivate, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

25

a) gegen c-Ha-ras, z. B.

SEQ ID NO. 5      5'- C A G C T G C A A C C C A G C -3'

SEQ ID NO. 6      5'-T A T T C C G T C A T -3'

SEQ ID NO. 7      5'-T T C C G T C A T C G C T C C T C A G G G G -3'

30

b) bFGF, z.B.

SEQ ID NO. 8      5'-GGCTGCCATGGTCCC-3'

c) c-myc, z.B.

5    SEQ ID NO. 9      5'-GGCTGCTGGAGCGGGGCACAC-3'  
      SEQ ID NO. 10     5'-AACGTTGAGGGGCAT-3'

d) c-myb, z.B.

10   SEQ ID NO. 11    5'-GTGCCGGGGTCTTCGGGC-3'

e) c-fos, z.B.

     SEQ ID NO. 12    5'-CGAGAACATCATCGTGG-3'  
 15   SEQ ID NO. 13    5'-GGAGAACATCATGGTCGAAAG-3'  
      SEQ ID NO. 14    5'-CCCGAGAACATCATGGTCGAAAG-3'  
      SEQ ID NO. 15    5'-GGGGAAAGCCCGGCAAGGGG-3'

f) p120, z. B.

20

     SEQ ID NO. 16    5'-CACCCGCCTTGGCCTCCAC-3'

g) EGF-Rezeptor, z.B.

25   SEQ ID NO. 17    5'-GGGACTCCGGCGCAGCGC-3'  
      SEQ ID NO. 18    5'-GGCAAACCTTTCTTTCTCC-3'

h) p53 Tumorsuppressor, z.B.

30   SEQ ID NO. 19    5'-GGGAAGGAGGAGGATGAGG-3'  
      SEQ ID NO. 20    5'-GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG-3'

i) bcl-2, z. B.

SEQ ID NO. 21 5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3'

5 k) VEGF, z. B.

SEQ ID NO. 22 5'-GCGCTGATAGACATCCATG-3'

SEQ ID NO. 23 5'-GGAGGCCCGACC-3'

SEQ ID NO. 24 5'-GGTTTCGGAGGC-3'

10 SEQ ID NO. 25 5'-TGGTGGAGGTAG-3'

SEQ ID NO. 26 5'-GCATGGTGGAGG-3'

SEQ ID NO. 27 5'-TTGGCATGGTGG-3'

SEQ ID NO. 28 5'-GCCCTGGGACCAC-3'

SEQ ID NO. 29 5'-CAGCCTGGGACC-3'

15 SEQ ID NO. 30 5'-TG CAGCCTGGGA-3'

SEQ ID NO. 31 5'-GTGCAGCCTGGG-3'

SEQ ID NO. 32 5'-GGTGCAGCCTGG-3'

SEQ ID NO. 33 5'-ATGGGTGCAGCC-3'

SEQ ID NO. 34 5'-GGCTTGAAGATG-3'

20 SEQ ID NO. 35 5'-GCAGCCCCCGCA-3'

SEQ ID NO. 36 5'-GCAGCAGCCCCC-3'

l) c-raf Kinase, z. B.

25 SEQ ID NO. 37 5'-TCCCGCCTGTGACATGCATT-3'

m) PKC-alpha, z. B.

SEQ ID NO. 38 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA-3'

30

n) Protein Kinase A, z. B.

SEQ ID NO. 39 5'-G C G T G C C T C C T C A C T G G C-3'

Arzneimittel enthaltend PNA-Derivate der Formel I eignen sich beispielsweise ferner zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Integrine oder Zell-Zell-  
 5 Adhäsionsrezeptoren beeinflusst werden, beispielsweise durch VLA-4, VLA-2, ICAM, VCAM oder ELAM.

Antisense-PNA-Derivate, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

10

a) VLA-4, z. B.

SEQ ID NO. 40 5'-G C A G T A A G C A T C C A T A T C -3'

15 b) ICAM-1, z. B.

SEQ ID NO. 41 5'-G C C C A A G C T G G C A T C C G T C A-3'

SEQ ID NO. 42 5'- C C C C C A C C A C T T C C C C T C T C-3'

SEQ ID NO. 43 5'-C T C C C C C A C C A C T T C C C C T C-3'

20 SEQ ID NO. 44 5'-G C T G G G A G C C A T A G C G A G G-3'

c) ELAM-1, z. B.

SEQ ID NO. 45 5'-A C T G C T G C C T C T T G T C T C A G G -3'

25 SEQ ID NO. 46 5'- C A A T C A A T G A C T T C A A G A G T T C-3'

d) Integrin alpha(V), z. B.

SEQ ID NO. 47 5'-G C G G C G G A A A A G C C A T C G -3'

30

Arzneimittel enthaltend PNA-Derivate der Formel I eignen sich beispielsweise auch zur Verhinderung der Restenose. Dabei können PNA-Sequenzen zum Einsatz kommen, die gegen Targets gerichtet sind, die für Proliferation oder Migration verantwortlich sind. Solche Targets sind beispielsweise:

5

1) Nucleare Transaktivator-Proteine und Cycline wie beispielsweise c-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, Cycline und cdc2-Kinase

10

2) Mitogene oder Wachstumsfaktoren wie beispielsweise PDGF, bFGF, VEGF, EGF, HB-EGF und TGF- $\beta$ .

3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise bFGF-Rezeptor, EGF-Rezeptor und PDGF-Rezeptor.

15

Antisense-PNA-Derivate, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

a) c-myb, z. B.

20

SEQ ID NO. 48     5'-G T G T C G G G G T C T C C G G G C-3'

b) c-myc, z. B.

SEQ ID NO. 49     5'-C A C G T T G A G G G G C A T-3'

25

c) cdc2-Kinase, z. B.

SEQ ID NO. 50     5'-G T C T T C C A T A G T T A C T C A-3'

30

d) PCNA (proliferating cell nuclear antigen of rat), z. B.



SEQ ID NO. 51 5'-G A T C A G G C G T G C C T C A A A-3'

PNA-Derivate können ebenfalls zur Behandlung von Vitiligo und anderen Depigmentierungskrankheiten bzw. Depigmentierungsstörungen (z.B. der Haut, 5 Haare, Augen) wie beispielsweise Albinismus und Psoriasis verwendet werden, oder zur Behandlung von Asthma, wobei die Expression des Adenosin-A1-Rezeptors, Adenosin-A3-Rezeptors, Bradikinin-Rezeptors oder von IL-13 mit Hilfe geeigneter Antisense Agenzien inhibiert werden. Eine solche Basensequenz ist beispielsweise:

10

SEQ ID NO. 52 5'-G A T G G A G G G C G G C A T G G C G G G-3'

Arzneimittel enthaltend ein PNA-Derivat der Formel I können z.B. in Form von pharmazeutischen Präparaten, die man oral, z.B. in Form von Tabletten, 15 Dragees, Hart- oder Weichgelatine kapseln, Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen verabreichen kann, verwendet werden. Sie können auch rektal z.B. in Form von Suppositorien oder parenteral z.B. in Form von Injektionslösungen verabreicht werden. Für die Herstellung von pharmazeutischen Präparaten können diese Verbindungen in therapeutisch 20 inerten organischen und anorganischen Trägern verarbeitet werden. Beispiele von solchen Trägern für Tabletten, Dragees und Hartgelatine kapseln sind Laktose, Maisstärke oder Derivate davon, Talg und Stearinsäure oder Salze davon. Geeignete Träger für die Herstellung von Lösungen sind Wasser, Polyole, Saccharose, Invertzucker und Glucose. Geeignete Träger für 25 Injektionslösungen sind Wasser, Alkohole, Polyole, Glycerol und pflanzliche Öle. Geeignete Träger für Suppositorien sind pflanzliche und gehärtete Öle, Wachse, Fette und halbflüssige Polyole. Die pharmazeutischen Präparate können auch Konservierungsmittel, Lösemittel, Stabilisierungsmittel, Netzmittel, Emulgatoren, Süßstoffe, Farbstoffe, Geschmacksmittel, Salze zur Veränderung 30 des osmotischen Drucks, Puffer, Überzugsmittel, Antioxidantien, sowie ggf. andere therapeutische Wirkstoffe enthalten.

Bevorzugte Verabreichungsformen sind topische Applikationen, lokale Applikationen wie beispielsweise mit Hilfe eines Katheters oder durch Inhalation, Injektionen bzw. Infusionen und die orale Verabreichung. Zur Injektion werden die PNA-Derivate der Formel I in einer flüssigen Lösung, vorzugsweise in einem physiologisch annehmbaren Puffer, wie z.B. Hank's Lösung oder Ringer's Lösung, formuliert. Die Oligonucleotide können aber auch in fester Form formuliert werden und vor dem Gebrauch gelöst oder suspendiert werden. Die für die systematische Verabreichung bevorzugten Dosierungen betragen ca. 0,01 mg/kg bis ca. 50 mg/kg Körpergewicht und Tag.

10

Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Zubereitungen, die PNA-Derivate der Formel I und/oder deren physiologisch verträgliche Salze neben pharmazeutisch einwandfreien Träger- und/oder Zusatzstoffen enthalten. Die PNA-Derivate der Formel I und/oder deren physiologisch verträglichen Salze können am Tier, bevorzugt am Säugetier, und insbesondere am Menschen als Arzneimittel für sich allein, in Mischungen untereinander oder in Form von pharmazeutischen Zubereitungen verabreicht werden, die eine topische, perkutane, parenterale oder enterale Anwendung gestatten und die als aktiven Bestandteil eine wirksame Dosis mindestens eines PNA-Derivats, neben üblichen pharmazeutisch einwandfreien Träger- und Zusatzstoffen enthalten. Die Zubereitungen enthalten normalerweise etwa 0,1 bis 90 Gew.-% der therapeutisch wirksamen Verbindung. Zur Behandlung von Hautkrankheiten wird eine topische Anwendung, z.B. in Form von Salben, Lotionen oder Tinkturen, Emulsionen, Suspensionen bevorzugt.

25

Die Herstellung der pharmazeutischen Präparate erfolgt in an sich bekannter Weise, (z. B. Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publ. Co., Easton, PA.), wobei pharmazeutisch inerte anorganische und/oder organische Trägerstoffe verwendet werden. Für die Herstellung von Pillen, Tabletten, Dragees und Hartgelatine kapseln kann man z.B. Lactose, Maisstärke und/oder Derivate derselben, Talk, Stearinsäure und/oder deren Salze etc. verwenden.

30

Trägerstoffe für Weichgelatine kapseln und/oder Suppositorien sind z.B. Fette, Wachse, halbfeste und flüssige Polyole, natürliche und/oder gehärtete Öle etc. Als Trägerstoffe für die Herstellung von Lösungen und/oder Sirupen eignen sich z.B. Wasser, Saccharose, Invertzucker, Glukose, Polyole etc. Als

- 5 Trägerstoffe für die Herstellung von Injektionslösungen eignen sich Wasser, Alkohole, Glycerin, Polyole, pflanzliche Öle etc. Als Trägerstoffe für Mikrokapseln, Implantate und/oder Rots eignen sich Mischpolymerisate aus Glykolsäure und Milchsäure. Darüber hinaus sind Liposomenformulierungen, die dem Fachmann bekannt sind, geeignet (N. Weiner, Drug Develop Ind
- 10 Pharm 15 (1989) 1523; "Liposome Dermatics, Springer Verlag 1992), beispielsweise HVJ-Liposomen (Hayashi, Gene Therapy 3 (1996) 878). Die dermale Applikation kann beispielsweise auch unter Zuhilfenahme ionophoretischer oder Methoden und/oder mit Hilfe der Elektroporation erfolgen.

15

Eine pharmazeutische Zubereitung kann neben den Wirk- und Trägerstoffen noch Zusatzstoffe, wie z.B. Füllstoffe, Streck-, Spreng-, Binde-, Gleit-, Netz-, Stabilisierungs-, Emulgier-, Konservierungs-, Süß-, Färbe-, Geschmacks- oder Aromatisierungs-, Dickungs-, Verdünnungsmittel, Puffersubstanzen, ferner

- 20 Lösungsmittel und/oder Lösungsvermittler und/oder Mittel zur Erzielung eines Depoteffekts, sowie Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Überzugsmittel und/oder Antioxidantien enthalten. Sie können auch zwei oder mehrere verschiedene PNA-Derivate der Formel I und/oder deren physiologisch verträgliche Salze enthalten sowie ferner neben mindestens einem PNA-
- 25 Derivate der Formel I einen oder mehrere andere therapeutisch wirksame Stoffe. Die Dosis kann innerhalb weiter Grenzen variieren und ist in jedem einzelnen Fall den individuellen Gegebenheiten anzupassen.

- Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von PNA-Derivaten der Formel
- 30 I als Diagnostikum, insbesondere als Hilfsmittel in der DNA-Diagnostik und in der Molekularbiologie (siehe zum Beispiel: Peptide Nucleic Acids: Protocols

and Applications; Peter E. Nielsen und Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999). In der DNA-Diagnostik spielen Gensonden, auch DNA-Sonden oder Hybridization-Sonden genannt, eine große Rolle zum sequenzspezifischen Nachweis bestimmter Gene. Eine Gensonde besteht im

5    allgemeinen aus einer Erkennungssequenz und einer bzw. mehreren geeigneten Markergruppen (Labeln). Die Spezifität der Bestimmung einer Targetsequenz in einer Analysenprobe mittels Hybridisierung mit einer komplementären Gensonde wird durch die Erkennungssequenz und deren chemische Struktur determiniert. Diese Technik kann auf PNA übertragen

10    werden. Die PNA hat gegenüber den Oligonucleotiden natürlicher Struktur den Vorteil, dass sie eine höhere Affinität zur Targetsequenz und eine höhere Fähigkeit zur Basendiskriminierung aufweist.

Die Anwendung der Verbindungen der Formeln I bezieht sich daher auch auf

15    die in-situ-Hybridisierung und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Die in-situ-Hybridisierung kann beispielsweise auch zum Nachweis von Mikroorganismen und Viren dienen (Just et al. (1998) J. Vir. Method. 73, 163-174). Eine weitere Anwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen bezieht sich zum Nachweis und Quantifizierung von Nukleinsäuren. Hierzu bedient man sich

20    bevorzugt auch der Array-Technologie (Strother et al. J. Am. Chem. Soc. (2000) 122, 1205-1209; Niemeyer et al., Angew. Chem. (1999) 111, 3039-3043; Pirrung (1997) Chem. Rev. 97, 473-488), die einen hohen Probendurchsatz und hohe Empfindlichkeit aufweist. Dabei werden die PNA-Sonden auf einem geeigneten Träger oder PNA-Chip fixiert. Hierzu kann PNA wie in den

25    Beispielen beschrieben synthetisiert werden und nachfolgend auf den Träger oder PNA-Chip fixiert werden. Alternativ kann die PNA direkt auf dem Träger hergestellt werden. Eine weitere Anwendung ist der Einsatz der Verbindungen der Formel I als Biosensoren zur Detektion von Nukleinsäuren (Wang et al (1996) J. Am. Chem. Soc. 118, 7667). Der Einsatz von PNA der Formel I mit

30    einem Affinitätslabel, wie beispielsweise Histidyl-PNA, ist eine weitere

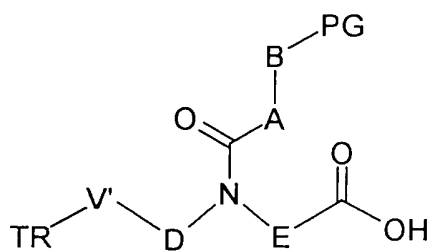
Anwendung zur Reinigung von Nukleinsäuren (Oerum et al. (1999), in *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications*).

- Die beiden Phosphorylreste am Amino- und Carboxy-Terminus können
- 5 unterschiedliche Funktionen erfüllen. Beispielsweise kann der Amino-Terminus zur Erhöhung der zellulären Aufnahme lipophil substituiert sein, während sich am Carboxy-Terminus ein Fluorescein-Rest zum Nachweis der verbesserten Zellaufnahme befindet (vgl. PNA-6 in Beispiel 7).
- 10 Die zweifach derivatisierten Verbindungen der Formel I eignen sich auch als sogenannte "Molecular Beacons" (Li et al. (2000) *Angew. Chemie* 112, 1091-1094), die erst bei der Bindung an eine komplementäre Nukleinsäure ein Fluoreszenzsignal abgeben. In diesen Beacons ist ein Ende der PNA, beispielsweise der Amino-Terminus, mit einem Fluoreszenz-Label versehen,
- 15 während das andere Ende, beispielsweise der Carboxy-Terminus, mit einem Quencher versehen ist. Auch der umgekehrte Fall, in dem der N-Terminus einen Quencher trägt, und der C-Terminus ein Fluoreszenz-Label, ist möglich. Dadurch kommt es zur Unterdrückung des Fluoreszenzsignals, solange das zweifach markierte PNA-Derivat nicht an eine komplementäre Nukleinsäure
- 20 bindet. Erst bei der Bindung werden der Fluoreszenz-Rest (z.B. Edans) und der Quencher (z. B. Dabcyl) räumlich voneinander getrennt, so dass ein Fluoreszenzsignal ausgesandt wird (Sokol et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 11538).
- 25 Die Synthese des PNA-Rückgrates erfolgt nach den in der Literatur beschriebenen Methoden, zum Beispiel nach der tert-Butyloxycarbonyl- (BOC), 9-Fluorenylmethoxycarbonyl- (Fmoc) oder Monomethoxytrityl- (Mmt) Schutzgruppen-Strategie (*Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications*; Peter E. Nielsen und Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999).
- 30 Vorzugsweise wird die Mmt-Schutzgruppe zum temporären Schutz der Aminofunktion des Aminoethylglycins verwendet und basenlabile

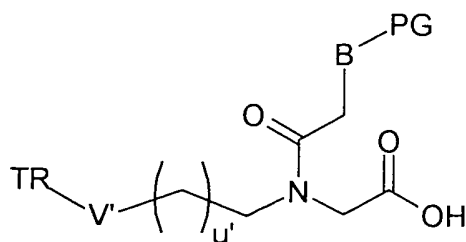
Schutzgruppen an den heterozyklischen Nucleobasen (D. Will et al. (1995) Tetrahedron 51, 12069; Breipohl et al. (1997) Tetrahedron 53, 14671-14686).

Beispiele für Monomerbausteine sind Verbindungen der Formel V bis V D, wobei A, B, D, E, u' und V' obige Bedeutung haben, PG eine Aminosäure-

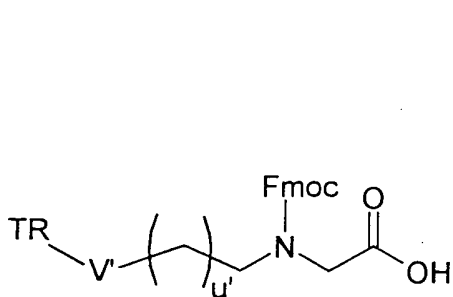
- 5 Schutzgruppe wie beispielsweise Benzoyl, Anisoyl-, Isobutyryl-, Acetyl-, tert-Butylbenzoyl (Breipohl et al. (1997) Tetrahedron 53, 14671-14686) ist, TR eine säurelabile Schutzgruppe wie Dimethoxytrityl (Dmt) (für V' = O und S) oder Mmt (für V' = NH) ist.



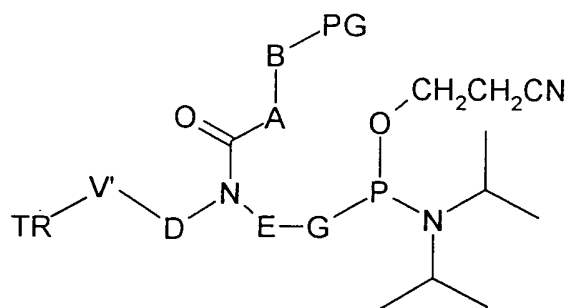
Formel V



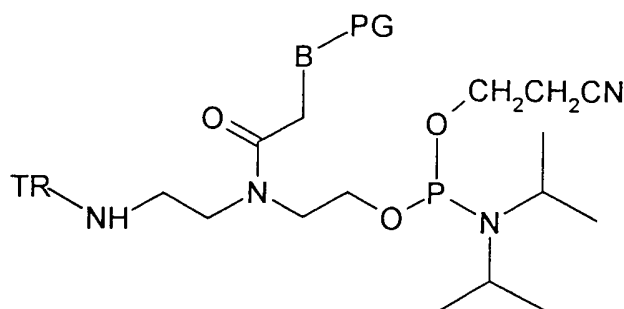
Formel V A



Formel V B



Formel V C



Formel V D

Nach Aufbau des PNA-Rückgrates kann die freie Aminofunktion des N-Terminus direkt mit einem entsprechenden Phosphorylierungsreagenz beispielsweise zu einem Phosphoramidat ( $V' = NR_1$  in Formel I) umgesetzt werden.

5

Die Phosphoryl-Reste können mit Hilfe von in der Nucleotid-Chemie üblicherweise verwendeten Reagenzien eingeführt werden. Es sind zahlreiche Phosphorylierungsreagenzien zugänglich, die zur Herstellung der Verbindungen der Formel I herangezogen werden können. Eine Auswahl der Reagenzien ist in den Figuren 4a bis 4d gezeigt, wobei die Erfindung aber nicht auf diese spezielle Derivate beschränkt ist. Für die carboxyterminale Modifikation kommen entsprechend modifizierte Träger, insbesondere CPG-Träger für die Festphasensynthese zum Einsatz. Beispiele solcher Träger sind in Figur 6 aufgeführt.

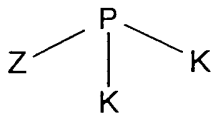
15

Als Phosphorylierungsreagenzien können die in der Nucleotidchemie üblichen Reagenzien eingesetzt werden (Glen Research Corporation, Sterling, VA 20164, U.S.A.; Figur 4a bis 4d), die beispielsweise nach der Phosphoramidit-Methode, der H-Phosphonat-Methode oder der Phosphotriester-Methode reagieren (E. Sonveaux (1986) Bioorganic Chemistry 14, 274; S. L. Beaucage und R. P. Iyer (1993) Tetrahedron 49, 1925; E. Uhlmann und A. Peyman (1990) Chem. Rev. 90, 543). Die Vielfalt der möglichen Modifikationen ist durch die große Zahl der bekannten Phosphorylierungsreagenzien und entsprechend derivatisierter Träger, insbesondere von controlled pore glass (CPG) Trägern, bestimmt. Als feste Träger werden ausserdem bevorzugt @TentaGel (Fa. Rapp Polymers GmbH, Tübingen) und Aminomethylpolystyren benutzt.

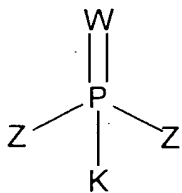
25

Zur Einführung der Phosphoryl-Funktion kommen im Prinzip alle in der Nucleotidchemie bekannten Reagenzien in Betracht, insbesondere aber die folgenden Reagenzien der Formel VI A, Formel VI B, Formel VI C und Formel VI D,

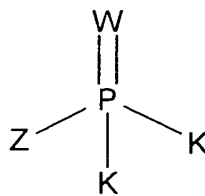
30



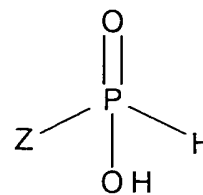
Formel VI A



Formel VI B



Formel VI C



Formel VI D

- wobei K gleich Halogen, bevorzugt Cl, Triazolyl, Imidazolyl, oder Dialkylamino ist, W die oben genannte Bedeutung oder die Bedeutung von W' haben kann, und Z die oben genannte Bedeutung oder die Bedeutung von X, X' oder Z' haben kann, wobei reaktive Gruppen entsprechend geschützt sind.

Beispielsweise sind die Hydroxygruppen des Fluorescein-Phosphoramidits 3 (Figur 4a) durch Veresterung mit Pivalinsäure geschützt.

10

- Die Verbindungen der Formel VI sind nur als Beispiele für solche Reagenzien zu sehen, die gegebenenfalls unter Zugabe weiterer Hilfsreagenzien wie Basen, Säuren oder Kondensationsreagenzien reagieren. Besonders bevorzugt sind die Reagenzien der Formel VI A, die nach der Phosphoramidit-Methode reagieren (Beaucage und Iyer, 1993). Diese werden als Phosphor-(III)-Verbindung zur Reaktion gebracht und anschließend oxidiert. Wird die Oxidation beispielsweise mit Jod/Wasser/Pyridin oder tert-Butylhydroperoxid durchgeführt, erhält man die Phosphorylderivate (W = O). Erfolgt die Oxidation dagegen mit elementarem Schwefel oder Beaucage-Reagenz, so erhält man die entsprechende Thiophosphoryl-Verbindung (W = S).

20

- Unter den Reagenzien (Figuren 4a bis 4d) befinden sich auch "bifunktionelle Reagenzien", die aufgrund einer zweiten Funktion, welche zunächst geschützt ist, mehrfach zur Reaktion gebracht werden können. Beispiele für solche bifunktionellen Reagenzien sind die Phosphoramidite 4, 6, 8 bis 13. Dabei kann es sich um die multiple Konjugation eines Reagenzes oder aber um die sukzessive Reaktion mit unterschiedlichen Reagenzien handeln. So kann beispielsweise das Fluorescein-Phosphoramidit 3 nur einmal zur Reaktion

25



gebracht werden. Dagegen besitzt das Fluorescein-Phosphoramidit 4 eine durch eine Dmt-Gruppe geschützte Hydroxyfunktion, die nach Abspaltung der Dmt-Gruppe nochmals mit einem Phosphorylierungsreagenz zur Reaktion gebracht werden kann. Auf diese Weise können ein und dieselbe Gruppe oder  
5 aber unterschiedliche Gruppen mehrfach eingeführt werden. PNA-6 ist ein Beispiel für eine Mehrfachkonjugation am Carboxyterminus und einer zusätzlichen Modifikation am Aminoterminal. Zunächst wurden am Carboxyterminus sukzessive das Fluorescein und der Aminolinker aufgebaut. Nach der Synthese des PNA-Teils wurde im letzten Zyklus ein Hydroxyethylglycin-t  
10 Baustein gekoppelt, der mit dem C16-Phosphorylierungsreagenz 7 zur Reaktion wurde. PNA-1 und PNA-2 sind Verbindungen der Formel I, die nur carboxyterminal mit einem Phosphoryl-Rest modifiziert sind ( $q = 0$ ). Diese Substanzklasse ist ebenfalls neu und Gegenstand der Erfindung.

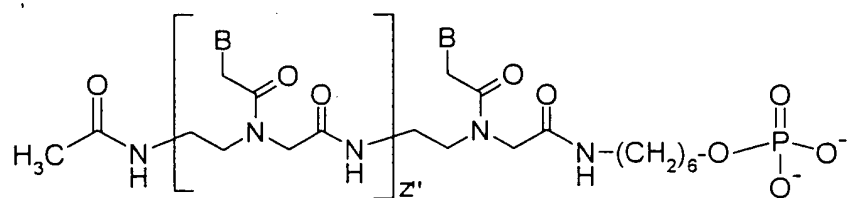
In Figur 5a und 5b sind einige Beispiele von Verbindungstypen für die N-terminale Modifikation der Verbindungen der Formel I gezeigt. Verbindungstyp  
15 A erhält man durch Reaktion der endständigen Hydroxygruppe der PNA mit dem Phosphorylierungsreagenz 1. Verbindungstyp B erhält man durch Reaktion der endständigen Aminogruppe der PNA mit dem Biotin-Phosphoramidit 5. Verbindungstyp C erhält man durch sukzessive Umsetzung  
20 der PNA mit einer endständigen Hydroxygruppe mit dem Spacer-18 Phosphoramidit 9, Aminomodifizier-5 Phosphoramidit 12 und Lexitropsin. Verbindungstyp D erhält man durch sukzessive Umsetzung der PNA mit einer endständigen Hydroxygruppe mit dem Spacer-9 Phosphoramidit 8 und dem Cyanin-3 Phosphoramidit 10. Verbindungstyp E erhält man durch sukzessive  
25 Umsetzung der PNA mit einer endständigen Hydroxygruppe mit dem bifunktionellen Fluorescein-Phosphoramidit 4, dem Spacer-9 Phosphoramidit 8, und dem C16-Phosphorylierungsreagenz 7. Die zusätzlich durchzuführenden Schritte, wie Oxidation und Schutzgruppenabspaltung, sind in den Beispielen beschrieben.

Ein Beispiel für eine carboxyterminale Modifikation von PNA mit Hilfe eines Phosphoramidits der Formel V D ist in Figur 7 dargestellt. Dabei geht man von einem Bishydroxyethylsulfon-Träger 1 (Figur 6) aus, der nach Abspaltung der Dmt-Gruppe mit 3% Trichloressigsäure mit dem Phosphoramidit der Formel V D unter Tetrazolkatalyse umgesetzt wird. Nach Oxidation mit Jodwasser spaltet man die aminoternale Mmt-Gruppe mit 3% Trichloressigsäure ab und synthetisiert dann den PNA-Teil nach literaturbekannten Methoden, beispielsweise nach der unten erläuterten Mmt-Methode. Eine alternative Methode zur carboxyterminalen Modifikation macht von CPG-Trägern Gebrauch, die entsprechend dem einzuführenden Rest modifiziert sind, also beispielsweise den Fluorescein-Rest enthalten (Figur 8). Diese Methode soll am Beispiel eines PNA-Derivates erläutert werden, das aminoterminal mit einem Hexadecylphosphat-Rest und carboxyterminal mit einem Fluoresceinphosphat modifiziert ist. Zunächst wird der Fluorescein-Träger 3 (Figur 6) mit Trichloressigsäure detrityliert und dann mit dem Aminomodifizier-C6 Phosphoramidit 13 (Figur 4d) mit Hilfe von Tetrazol kondensiert. Nach Oxidation mit Jodwasser und Abspaltung der Mmt-Gruppe kann der PNA-Teil nach gängigen Methoden synthetisiert werden. Im letzten Zyklus wird ein auf Hydroxyethylglycin basierender PNA-Baustein (Formel V A,  $u' = 2$ ,  $v' =$  Sauerstoff) gekuppelt, der nach Abspaltung der Dmt-Schutzgruppe mit Hilfe des C16-Phosphorylierungsreagenzes 7 wie in Figur 9 gezeigt umgesetzt wird. Nach Abspaltung aller Schutzgruppen und Spaltung vom CPG-Träger erhält man das zweifach modifizierte PNA-Derivat.

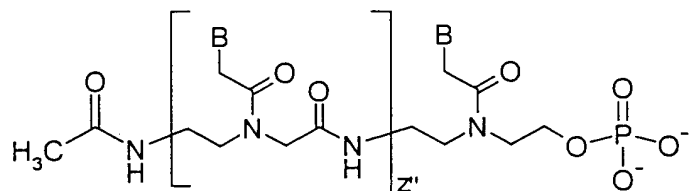
Beispiele:

Die Herstellung folgender Verbindungen ist exemplarisch beschrieben:

PNA-1:

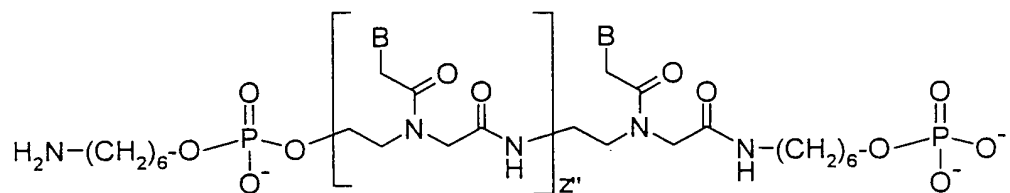


PNA-2:



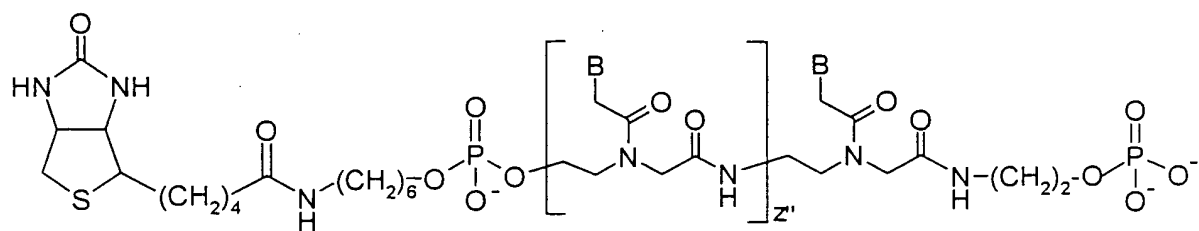
5

PNA-3:



10

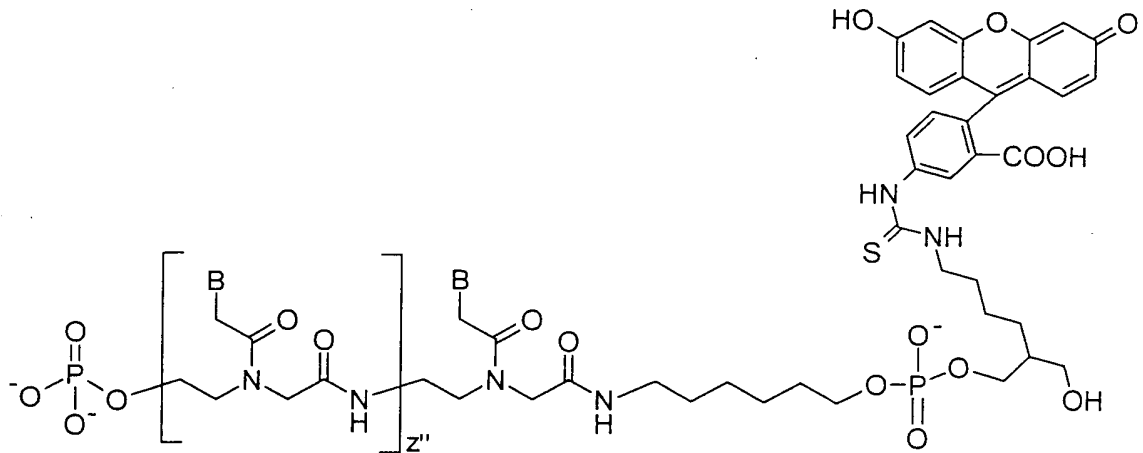
PNA-4:



15

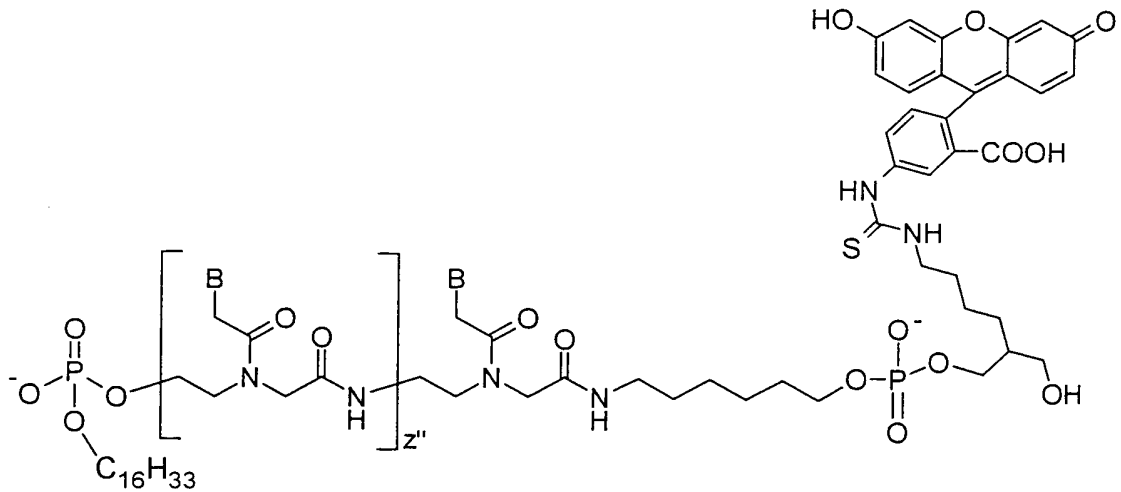
20

PNA-5:



5

PNA-6:



- 10 wobei die Abfolge der Basen B jeweils durch SEQ ID NO. 53 beschrieben wird,  
und z'' jeweils gleich 10 ist:

SEQ ID NO. 53 5'-T A T T C C G T C A T-3'

(PNA-1 bis PNA-6)

15

### Beispiel 1: Synthese der PNA-Kette

Zur Herstellung des PNA-Teils wurden die folgenden Reagenzien verwendet:

1. Phosphoramidit-Reagenz (0.1 M in Acetonitril (ACN))
- 5 2. Mmt-PNA-Monomere bzw. Dmt-oeg-PNA-Monomere (0.2 M in DMF:ACN (1:1; v:v))
3. Wasserfreies ACN ( $\leq 30$  ppm water)
4. Trichloressigsäure (3 %) in Dichloromethan (DCM)
5. Acetanhydrid, 2,6-Lutidin in THF (1:1:8; v:v:v); (Cap A)
- 10 6. N-Methylimidazol (16 %) in THF; (Cap B)
7. Jodlösung (0.05 M) in THF, Wasser, Pyridin, (7:2:1; v:v:v)
8. Waschlösung (THF, Wasser, Pyridin (7:2:1; v:v:v))
9. Tetrazol (0.3 M) in ACN
10. HBTU; 0.2 M in DMF:ACN (1:1; v:v)
- 15 11. DIPEA; 0.2 M in DMF:ACN (1:1; v:v)
12. DMF ( $> 99.5$  %)
13. Festphasenträger: Aminopropyl-CPG (550 Å) beladen mit Mmt-Aminohex-1-yl hemisuccinat (für PNA-hexylamide).
- 20 Die Mmt/Acyl-geschützten bzw. Dmt/Acyl-geschützten oeg-Monomere wurden wie bereits beschrieben hergestellt (Breipohl et al. (1997) Tetrahedron 53, 14671-14686). Die Beladung von Aminopropyl-CPG mit dem Mmt-Aminohex-1-yl-hemisuccinat wurde ebenfalls bereits beschrieben (Will et al. (1995) Tetrahedron 51, 12069-12082). Die derivatisierten CPG-Träger sind
- 25 kommerziell erhältlich (Glen Research Corporation, Sterling, VA 20164, U.S.A.). Die PNA-Synthesen wurden im allgemeinen im Massstab von 2 to 5  $\mu$ mol durchgeführt.

Folgender Zyklus wurde zur PNA-Synthese verwendet:

30

1. Waschschrift mit ACN

2. Entschützung der Mmt-Gruppe bzw. Dmt-Gruppe durch Behandlung mit 3% TCA in DCM; 110 sec.
3. Waschschrift mit DMF/ACN (1:1)
4. Neutralisierung mit DIPEA in DMF/ACN (1:1)
- 5 5. Kupplung des Monomer-Bausteins durch Voraktivierung (15 min)  
mit HBTU/DIPEA/PNA-Monomer (Verhältnis 1:1:1; Gesamtvolumen 450 µl)  
Beschickung der Festphase und Kupplung (45 min)
6. Waschschrift mit ACN
7. Capping mit Acetanhydrid/N-Methylimidazol
- 10 8. Waschschrift mit ACN
9. Neuer Zyklus

Beispiel 2: Synthese von acetyl-tat tcc gtc at-aminohexyl-p (PNA-1)

- 15 Zunächst wird vom Bishydroxyethylsulfonyl-Träger 1 (1 µmol, Figur 6) durch  
Behandlung mit 3% Trichloressigsäure die Dmt-Schutzgruppe abgespalten.  
Dann wird die freie Hydroxyfunktion mit dem Aminomodifier-C6 Phosphoramidit  
13 (Figur 4d) unter Tetrazol-Katalyse zur Reaktion gebracht. Dabei werden das  
Phosphorylierungsreagenz 13 im Überschuss (ca. 25-fach) als 0.3 M Lösung in  
20 Acetonitril/Tetrahydrofuran (1:1; v:v) und das Tetrazol (ca. 50-fach; 0.5 M in  
Acetonitril) eingesetzt. Nach erfolgter Kondensation wird mit einer Jodlösung  
(0.05 M in Tetrahydrofuran/ Wasser, Pyridin (7:2:1; v:v:v)) oxidiert. Danach wird  
der PNA-Teil wie in Beispiel 1 beschrieben durch Festphasensynthese  
hergestellt. Im letzten Zyklus wird die freie Aminofunktion durch Behandlung mit  
25 dem Capping-Reagenz acetyliert. Dies verhindert bei der Entschützung mit  
konz. Ammoniak den aminoterminalen Abbau der PNA. Schließlich wird die  
PNA durch Behandlung mit konz. Ammoniak bei 50°C über Nacht vom Träger  
gespalten und gleichzeitig die Schutzgruppen entfernt. Man erhält 103 OD  
(260) des gewünschten Rohprodukts, das durch präparative Polyacrylamid  
30 (PAA)-Gelelektrophorese gereinigt wurde. Die gewünschte Produktbande wird mit  
0.2M Triethylammoniumbikarbonat-Puffer eluiert und über eine Bond-Elut C18-

Gel-Elektrophorese gereinigt wurde. Man erhält 22.5 OD Produkt mit dem Molekulargewicht 3303.8 (ber. 3305.0)

Beispiel 5: Synthese von Biotin-p-t(oeg) at tcc gtc at-aminohexyl-p (PNA-4)

5

Die Herstellung erfolgt analog wie in Beispiel 2 beschrieben in einer 0.5 µmol Synthese. Nach Aufbau des Carboxyterminus und Synthese des PNA-Teils wird im letzten Zyklus allerdings ein auf Hydroxyethylglycin basierender Baustein mit Thymin als Nucleobase (oegT) gekuppelt. Nach Spaltung der Dmt-Gruppe wird die freie Hydroxyfunktion mit dem Biotin-Phosphoramidit 5 (Figur 4b) unter Tetrazol-Katalyse gekuppelt und anschliessend mit Jodwasser oxidiert und mit Trichloressigsäure detrityliert. Durch Behandlung mit konz. Ammoniak bei 50°C spaltet man das Oligomer vom Träger und entfernt gleichzeitig alle Schutzgruppen. Man erhält 37 OD des Rohproduktes, das durch Gel-

10

15

Elektrophorese gereinigt wurde. Man erhält 22.5 OD.

Beispiel 6: Synthese von p-t(oeg) at tcc gtc at-aminohexyl-p-Fluorescein (PNA-5)

20 Die Synthese erfolgt analog Beispiel 2 ausgehend vom Fluorescein-Träger 3 (Figuren 6a und 8). Vom Fluorescein-Träger 3 wird durch Behandlung mit 3% Trichloressigsäure die Dmt-Schutzgruppe abgespalten. Dann wird die freie Hydroxyfunktion mit dem Aminomodifizier-C6 Phosphoramidit 13 (Figur 4d) unter Tetrazol-Katalyse zur Reaktion gebracht. Nach erfolgter Kondensation wird mit

25 einer Jodlösung (0.05 M in Tetrahydrofuran/ Wasser, Pyridin (7:2:1; v:v:v)) oxidiert. Danach wird der PNA-Teil wie in Beispiel 1 beschrieben durch Festphasensynthese hergestellt. Im letzten Zyklus wird ein auf Hydroxyethylglycin basierender Baustein mit Thymin als Nucleobase ((t)oeg) gekuppelt. Nach Spaltung der Dmt-Gruppe wird die freie Hydroxyfunktion mit dem

30 Phosphorylierungsreagenz 1 (Figur 4a) unter Tetrazol-Katalyse gekuppelt und anschliessend mit Jodwasser oxidiert. Schliesslich wird die PNA durch

Behandlung mit konz. Ammoniak bei 50°C über Nacht vom Träger gespalten und gleichzeitig die Schutzgruppen entfernt. Man erhält 61 OD (260) des Rohprodukts, das durch präparative Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese gereinigt wurde. Die gewünschte Produktbande wird mit 0.2M Triethyl-

5 ammoniumbikarbonat-Puffer eluiert und über eine Bond-Elut C18-Säule (1 g) entsalzt. Man erhält 5.6 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-

Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse zeigte (ber. 3709.5; gef. 3706.3)

10 Beispiel 7: Synthese von C16-p-t(oeg) at tcc gtc at-aminohexyl-p-Fluorescein (PNA-6)

Die Synthese erfolgt analog Beispiel 6 ausgehend von 1 µmol Fluorescein-Träger 3 (Figuren 6a und 8). Im letzten Zyklus wurde ein auf Hydroxyethylglycin

15 basierender Baustein mit Thymin als Nucleobase ((t)oeg) gekuppelt. Nach Spaltung der Dmt-Gruppe wird die freie Hydroxyfunktion jedoch mit dem C16-Phosphorylierungsreagenz 7 (Figur 4c) unter Tetrazol-Katalyse gekuppelt und anschliessend mit Jodwasser oxidiert. Schliesslich wird die PNA durch

20 Behandlung mit konz. Ammoniak bei 50°C über Nacht vom Träger gespalten und gleichzeitig die Schutzgruppen entfernt. Man erhält 61 OD (260) des gewünschten Rohprodukts, das durch präparative Polyacrylamid (PAA)-

Gelelektrophorese gereinigt wurde. Die gewünschte Produktbande wird mit 0.2M Triethylammoniumbikarbonat-Puffer eluiert und über eine Bond-Elut C18-Säule (1 g) entsalzt. Man erhält 4.6 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-

25 Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse zeigte (ber. 3934, gef. 3931).

Beispiel 8: Bestimmung der Schmelztemperaturen

30 Die Bestimmung der Schmelztemperaturen erfolgte mit Hilfe eines HP 8452A Diodenarray-Spektrophotometers, eines HP 89090A Peltier-Elements und der



HP Temperature Control Software Rev. B5.1 (Fa. Hewlett Packard). Es wird in 0.5°C/min Schritten in 140 mM KCl, 10 mM Natriumdihydrogenphosphat, 0.1mM EDTA (pH 7.4) als Puffer gemessen. Die Oligomerkonzentration beträgt 0.5 bis 1 OD<sub>260</sub> pro ml.

5

Überraschenderweise zeigten die zweifach phosphorylmodifizierten PNA-5 und PNA-6 Derivate mit zwei bzw. drei negativen Ladungen eine gleich gute oder bessere Bindung gegenüber komplementärer DNA und RNA wie die ungeladene PNA (Referenzsubstanz).

10

PNA-Derivat		T <sub>m</sub> (DNA)	T <sub>m</sub> (RNA)
Referenz	Ac-HN-tat tcc gtc at-hex	41.9 °C	56.6 °C
PNA-5	p-t(oeg) at tcc gtc at-aminohexyl-p-Fluorescein	41.8 °C	56.9 °C
PNA-6	C16-p-t(oeg) at tcc gtc at-aminohexyl-p-Fluorescein	44.1 °C	56.9 °C

#### Beispiel 9: Bestimmung der Zellaufnahme nach Fluoreszenz-Markierung

Man läßt die COS-Zellen bis zur Konfluenz in Dulbecco's MEM, das mit 10 % FCS supplementiert wurde, in 5 cm Petrischalen heranwachsen. Die Zellen werden zweimal mit serumfreien DMEM gewaschen. Mit Hilfe einer sterilen Nadel wird eine Fläche von ca. 1 cm<sup>2</sup> in der Mitte der Petrischale eingekratzt. In diese Fläche wird die zu untersuchende PNA-Lösung (10 µM) aufgebracht. Es wird bei 37 °C unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Nach 2, 4 und 16 Stunden werden die Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu werden die Zellen viermal mit serumfreien DMEM gewaschen, mit einem Glasträger abgedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop bzw. durch Phasenkontrast bewertet. PNA-5 und PNA-6 wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Dabei zeigte sich, dass das Hexadecyl-PNA-Derivat (PNA-6) effizienter in die Zellen aufgenommen wurde als die PNA ohne Hexadecyl-Rest.

#### Beispiel 10: Hemmung der Zellproliferation durch PNA-6

5

- Die Sequenz von PNA-6 ist gegen den Translationsstart der Ha-ras mRNA gerichtet. Die REH Zellen (human pre-B leukemia cells, DSM ACC 22) oder A549 Tumor zellen wurden in OptiMEM (Gibco BRL) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS, GIBCO-BRL) bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die
- 10 Zelldichte für den Assay war ca.  $1 \times 10^6$  / ml ). Die PNA-6 (10 µM ) wurde mit den Zellen in 24-well Platten inkubiert. Nach 96 Inkubation bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> wurde die Zelldichte bestimmt. Mittelwerte der Zelldichte wurden aus 3 individuellen Löchern einer PNA Konzentration ermittelt. Es zeigte sich, dass
- 15 Inkubationszeit ist die Hemmung durch PNA-6 stärker als durch ein entsprechendes Phosphorothioat-Oligonucleotid.

#### Abkürzungsverzeichnis:

20

ACN	Acetonitril
BOC	tert-Butyloxycarbonyl
<u>C</u> , <u>c</u>	pseudo-iso-Cytosin
COS	CV1 Origin SV 40
CPG	controlled pore glass
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	Dulbecco's MEM
DMF	Dimethylformamid
Dmt	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DNP	Dinitroaryl
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
hex	-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -OH
MEM	Modified Eagle's minimal essential medium
Mmt	Monomethoxytrityl
OD	Optische Dichte
oeg	N-(2-Hydroxyethyl)glycin
PAA	Polyacrylamid
PG	Schutzgruppe
PNA	Polyamidnukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
TCA	Trichloressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TR	säurelabile Schutzgruppe

Figuren 1a, 1b, 2b und 3b zeigen Beispiele für endständige Reste Z und Z'.

Figuren 2a und 3a zeigen Beispiele für verbrückende Reste X und X'.

5

Figuren 4a, 4b, 4c und 4d zeigen Beispiele für Phosphorylierungsreagenzien.

Figuren 5a und 5b zeigen Beispiele für die einfache (A, B) und multiple (C bis E) Derivatisierung am N-Terminus von PNA.

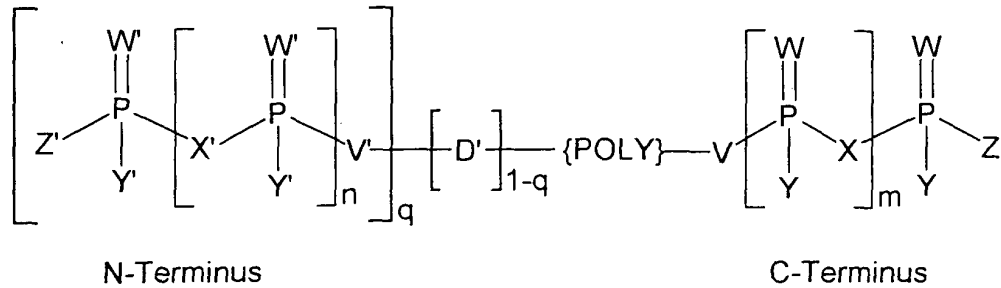
10

Figur 6 zeigt Beispiele für Träger-gebundene Reagenzien für die Festphasensynthese.

Figuren 7, 8 und 9 zeigen Beispiele für die Synthese C- und N-terminal  
5 modifizierter PNA.

## Patentansprüche:

1. PNA-Derivat, das am C-Terminus oder am C- und N-Terminus des PNA-Rückgrates einen oder mehrere Phosphoryl-Reste trägt, wobei neben Oxo-  
5 auch Thio- und Imino-Phosphorylreste umfasst sind, und wobei mindestens einer der Phosphoryl-Reste eine oder mehrere deprotonierbare Gruppen, vorzugsweise Hydroxy- oder Mercapto-Gruppen trägt, und die Phosphoryl-Reste über eine Sauerstoff-Phosphor, eine Schwefel-Phosphor oder eine Stickstoff-Phosphor-Bindung entweder direkt oder über einen Spacer mit  
10 dem PNA-Rückgrat verknüpft sind.
2. PNA-Derivat gemäß Anspruch 1, wobei der Spacer beispielsweise ein Alkanoylamid, ein Poly(alkoxy)carboxamid oder eine Aminosäure sein kann, und wobei mindestens einer der Phosphoryl-Reste eine oder mehrere  
15 Hydroxy- oder Mercapto-Gruppe trägt, die in einem pH-Bereich von 4,5 bis 14, vorzugsweise 6,5 bis 12, besonders bevorzugt 6,5 bis 9 deprotonierbar ist, und wobei ferner der Phosphoryl-Rest beispielsweise ein Phosphat, ein Phosphonat, ein Thiophosphat, ein Phosphoamidat oder ein substituierter Phosphoryl-Rest ist, und wobei substituierte Phosphoryl-Reste  
20 gegebenenfalls eine oder mehrere Markergruppen, oder Gruppen zur Quervernetzung, oder Gruppen, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen, oder Gruppen, die die Bindungsaffinität des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigern, tragen.
- 25 3. PNA-Derivat der Formel I



Formel I

wobei

q gleich 0 oder 1 ist,

D' gleich Hydroxy, Mercapto, Amino, Alkylamino oder Acylamino ist,

V unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel,  $NR_1$  ist,

V' unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel,  $NR_1$ , eine Gruppe  $U-(CR_3R_4)_{u'}-C(O)-NH$  oder eine Gruppe  $U-(CH_2CH_2O)_{u'}-CH_2-C(O)-NH$  ist,

U unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel oder NH ist,

u' unabhängig voneinander gleich 1 bis 10 ist, vorzugsweise 1 bis 4, besonders bevorzugt 1,

W und W' unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel oder  $NR_1$  sind,

Y und Y' unabhängig voneinander gleich Hydroxy, Mercapto, Oxyanion, Thioat oder  $NR_1R_2$  sind,

- X und X' unabhängig voneinander gleich eine Gruppe  $U-(C_2-C_{22}-$   
 Alkandiyl)-U oder eine Gruppe  $U-(CH_2CH_2-O)_U$  ist,  
 oder gleich eine Markergruppe, oder eine Gruppe zur  
 Quervernetzung, oder eine Gruppe, die die intrazelluläre  
 Aufnahme begünstigt, oder eine Gruppe, die die Bindungs-  
 affinität des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigert, ist,  
 beispielsweise ein bifunktioneller Fluorescein-, Rhodamin-,  
 TAMRA-, Biotin-, Pyren-, Dinitrophenyl-, Cholesteryl-, Acridin-,  
 Adamantyl-, Vitamin E-, Cyaninfarbstoff-, Dabcyl-, Edans-,  
 Lexitropsin-, Psoralen-, BODIPY-, ROX-, R6G- oder  
 Digoxigenin-Rest,
- Z und Z' unabhängig voneinander gleich Hydroxy, Mercapto, Oxyanion,  
 Thioat oder  $NR_1R_2$ ,  $C_1-C_{22}$ -Alkyl,  $C_1-C_8$ -Arylalkyl,  $C_1-C_{22}$ -  
 Alkyl-U,  $C_1-C_8$ -Arylalkyl-U, Hydroxy- $C_1-C_{18}$ -U, Aminoalkyl-U,  
 Mercaptoalkyl-U ist,  
 oder eine Gruppe der Formel  $R_7(CH_2CH_2-O)_m$  ist, wobei  $R_7$   
 gleich Hydroxy, Amino oder  $C_1-C_{22}$ -Alkoxy und m gleich 1 bis  
 100 ist, vorzugsweise 2 bis 10,  
 oder gleich eine Markergruppe, oder eine Gruppe zur  
 Quervernetzung, oder eine Gruppe, die die intrazelluläre  
 Aufnahme begünstigt, oder eine Gruppe, die die Bindungs-  
 affinität des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigert, ist,  
 beispielsweise ein monofunktioneller oder bifunktioneller  
 Fluorescein-, Rhodamin-, TAMRA-, Biotin-, Pyren-,  
 Dinitrophenyl-, Cholesteryl-, Acridin-, Adamantyl-, Vitamin E-,  
 Cyaninfarbstoff-, Dabcyl-, Edans-, Lexitropsin-, Psoralen-,  
 BODIPY-, ROX-, R6G- oder Digoxigenin-Rest,

$R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander ein Rest bestehend aus Wasserstoff oder  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl bedeuten, vorzugsweise Wasserstoff,

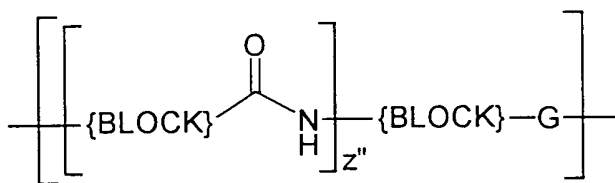
5  $R_3$  und  $R_4$  unabhängig voneinander ein Rest bestehend aus Wasserstoff oder  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl oder den Rest einer Aminosäure-Seitenkette bedeuten, vorzugsweise Wasserstoff, wobei benachbarte Reste  $R_3$  und  $R_4$  in V' auch einen  $C_5$ - $C_8$ -Cycloalkyl-Ring bilden können,

10

$n$  gleich 0 bis 10 ist, vorzugsweise 0 bis 3,

$m$  gleich 0 bis 10 ist, vorzugsweise 0 bis 3,

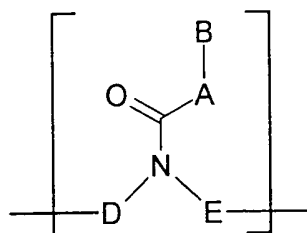
15 und wobei {POLY} beschrieben durch die Formel II wird,



Formel II

wobei ferner {BLOCK} unabhängig voneinander eine Gruppe ist ausgewählt aus Formel IIIA,

20

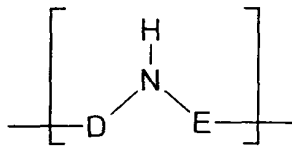


Formel III A

25



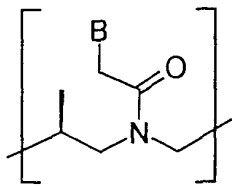
oder aus Formel IIIB,



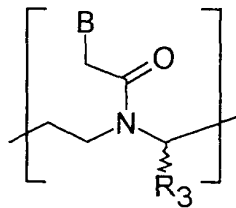
5

Formel III B

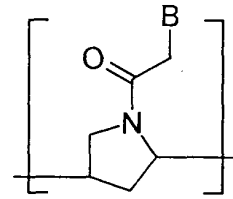
oder aus den Formeln IV A bis IV G,



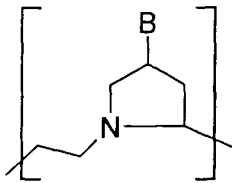
Formel IV A



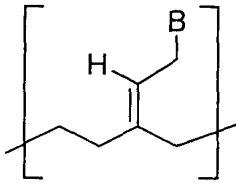
Formel IV B



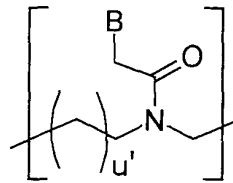
Formel IV C



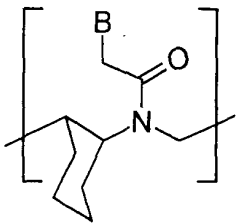
Formel IV D



Formel IV E



Formel IV F



Formel IV G

10 wobei jeder Baustein {BLOCK} verschieden sein kann,

und ferner gilt, dass

z'' gleich 0 bis 100 ist, vorzugsweise 1-20, besonders bevorzugt 4-15,

15

- G ausgewählt wird aus den Gruppen  $(CR_5R_6)_U$ ,  $C(O)NH-(CR_1R_2)_t$  oder  $C(O)NH-(CH_2CH_2O)_U-CH_2CH_2$  ist, wobei  $t'$  gleich 2 bis 10 ist, vorzugsweise 6,
- 5 A unabhängig voneinander eine Gruppe  $(CR_1R_2)_S$  ist, wobei  $s$  gleich 1 bis 3 ist, vorzugsweise 1,
- 10 B unabhängig voneinander entweder ein aromatischer Rest, der auch heteroaromatischen Charakter besitzen kann, oder Wasserstoff, oder Hydroxy oder  $C_1$ - $C_{18}$ -Alkyl ist, oder eine in der Nucleotidchemie übliche natürlich vorkommende oder eine nicht natürlich vorkommende Nucleobase oder deren Prodrugform ist,
- 15 D unabhängig voneinander eine Gruppe  $(CR_3R_4)_t$  ist, wobei  $t$  gleich 2 bis 10 ist, vorzugsweise 2 bis 4, besonders bevorzugt 2,
- 20 E unabhängig voneinander eine Gruppe  $(CR_5R_6)_U$  ist, wobei benachbarte Reste  $R_5$  und  $R_6$  auch einen  $C_5$ - $C_8$ -Cycloalkyl-Ring oder eine Spiroverbindung bilden können,
- 25  $R_5$  und  $R_6$  unabhängig voneinander einen Rest bestehend aus Wasserstoff oder  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl oder den Rest einer Aminosäure-Seitenkette bedeuten, vorzugsweise Wasserstoff,

sowie physiologisch verträglichen Salze des PNA-Derivates der Formel I,

mit den Massgaben, dass mindestens ein Rest Y, Y', Z oder Z' gleich Hydroxy oder Mercapto, und dass Oxyanion oder Thioat ist, und dass mindestens ein Rest B eine Nucleobase ist.

- 5     4. PNA-Derivat nach Anspruch 3, wobei mindestens ein Rest Y, Y', Z oder Z' in Formel I in einem pH-Bereich von 4,5 bis 14, vorzugsweise 6,5 bis 12, besonders bevorzugt 6,5 bis 9 gleich Oxyanion oder Thioat ist.
- 10     5. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 4, wobei n und m unabhängig voneinander gleich 0 sind.
6. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 5, wobei q gleich 1 ist.
- 15     7. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 6, wobei W und W' gleich Oxo sind.
8. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 7, wobei Y und Y' gleich Hydroxy oder Oxyanion sind.
- 20     9. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 8, wobei V und V' gleich Oxy sind.
10. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 9, wobei X und X' unabhängig voneinander gleich eine Gruppe U-(C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>-Alkandiyl)-U, bevorzugt O-(C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>-Alkandiyl)-O, besonders bevorzugt O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2-6</sub>O sind,
   
25     oder gleich eine Gruppe U-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>u'</sub>, bevorzugt O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>u'</sub>, besonders bevorzugt O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u'</sub> sind, wobei u' bevorzugt 1 bis 6 ist.
- 30     11. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 10, wobei X, X', Z und Z' unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe Fluorescein,

Rhodamin, TAMRA oder Cyanin-Farbstoff, Biotin, Dabcyl, Psoralen, Acridin, DNP oder Cholesterol, Vitamin E-, Dabcyl-, Edans-, Lexitropsin-, Psoralen-, BODIPY-, ROX-, R6G- oder Digoxigenin-Rest.

- 5 12. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 11, wobei X, X', Z und Z' unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe Monophosphat, Biotin-Derivat und Fluoreszein-Derivat.
13. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 11, wobei Z ein Fluoreszenz-Marker ist und Z' ein Quencher.
- 10 14. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 11, wobei Z ein Quencher ist und Z' ein Fluoreszenz-Marker.
- 15 15. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 11, wobei Z und Z' unabhängig voneinander ein C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>-Alkyl-Rest sind, oder ein C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>-U-Rest, bevorzugt ein C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>-Alkoxy-Rest, besonders bevorzugt C<sub>16</sub>-Alkoxy, oder Hydroxy-C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-U, bevorzugt Hydroxy-C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-O, besonders bevorzugt HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3-12</sub>O,
- 20 oder ein Aminoalkyl-U-Rest, bevorzugt ein Aminoalkoxy-Rest, besonders bevorzugt 6-Aminohexoxy oder 5-Aminopentoxy, oder eine Gruppe der Formel R<sub>7</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>m</sub> ist, wobei R<sub>7</sub> bevorzugt OH oder NH<sub>2</sub> ist und m gleich 1 bis 6 ist, besonders bevorzugt
- 25 HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>2</sub>, HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>6</sub> und H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>2</sub>, oder ein Mercaptoalkyl-V-Rest, bevorzugt ein Mercaptoalkoxy-Rest, besonders bevorzugt 6-Mercaptohexyloxy.
16. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 5, wobei q gleich 0 ist.

17. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 16, wobei D' gleich Acylamino ist, vorzugsweise Acetylamino.
18. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 17, wobei D gleich  $(\text{CH}_2)_t$ ,  
5 bevorzugt  $(\text{CH}_2)_2$  ist.
19. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 18, wobei A, E und G gleich  $\text{CH}_2$  sind.
- 10 20. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 19, wobei B gleich Adenin, Cytosin, 5-Methylcytosin, Guanin, Thymin und Uracil, oder gleich Purin, 2,6-Diaminopurin,  $\text{N}^4\text{N}^4$ -Ethanocytosin,  $\text{N}^6\text{N}^6$ -Ethano-2,6-diaminopurin, 5-( $\text{C}_3$ - $\text{C}_6$ )-Alkynyl-uracil, 5-( $\text{C}_3$ - $\text{C}_6$ )-Alkynyl-cytosin, 5-(1-Propargylamino)-uracil, 5-(1-Propargylamino)-cytosin, Phenoxazin, 9-  
15 Aminoethoxyphenoxazin, 5-Fluor-uracil oder Pseudoisocytosin, 5-(Hydroxymethyl)uracil, 5-Aminouracil, Pseudouracil, Dihydrouracil, 5-( $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ )-Alkyl-uracil, 5-( $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ )-Alkyl-cytosin, 5-( $\text{C}_2$ - $\text{C}_6$ )-Alkenyl-cytosin, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin, 7-Deazaadenin, 7-Deazaguanin, 8-Azapurin, oder ein 7-Deaza-7-  
20 substituiertes Purin ist.
21. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 3 bis 20, wobei die Basensequenz gegen Teile von Tumorsuppressor-Genen, Onkogenen oder Telomerasen oder deren Transkriptions-Produkte gerichtet ist.
- 25 22. PNA-Derivat nach Anspruch 21, wobei die Basensequenz des PNA-Teils gegen den Translationsstart von HA-ras mRNA gerichtet ist.

23. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1-12 oder 15-22 zur Verwendung als Arzneimittel.
- 5 24. Verwendung eines PNA-Derivates nach einem der Ansprüche 1-12 oder 15-22 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Tumorthherapie.
25. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur Verwendung als Diagnostikum.
- 10 26. Verwendung eines PNA-Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zum Nachweis von Mikroorganismen und/oder Viren.
27. Verwendung eines PNA-Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zum Nachweis und/oder Quantifizierung von Nukleinsäuren.
- 15 28. Verwendung eines PNA-Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 22 als Nachweisreagenz für die in-situ- oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.
- 20 29. Verwendung eines PNA-Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 22 als Antisense-, Anti-Gen-, Decoy-, oder Chimperaplast-Agenz.
30. Verwendung eines PNA-Derivates nach einem der Ansprüche 13 oder 14 als Molecular Beacon.
- 25 31. Nachweisreagenz enthaltend ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 22.
32. PNA-Chip, enthaltend ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 22.
- 30 33. Biosensor enthaltend ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 22.

34. Arzneimittel, enthaltend ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1-12 oder 15-22 und gegebenenfalls weitere pharmakologisch verträgliche Zusatz- und/oder Trägerstoffe.
- 5 35. Antisense-, Anti-Gen-, Decoy-, oder Chimperaplast-Agenz, enthaltend ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 22.
36. Verfahren zur Herstellung eines PNA-Derivats der Formel I, wobei
- 10 a) der C-Terminus einer Amidnukleinsäure mit einem festphasen- gebundenen Phosphorylierungs-Reagenz verknüpft wird, oder eine mit C-terminal phosphorylierte Amidnukleinsäure an einen festen Träger gebunden wird,
- b) das Rückgrat des PNA-Oligomers durch aktivierte Monomere verlängert wird,
- 15 c) gegebenenfalls am N-Terminus mit einem Phosphorylierungsreagenz umgesetzt wird.
37. Verfahren nach Anspruch 36, wobei die PNA unter Verwendung der Schutzgruppen t-Butyloxycarbonyl (BOC), 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) oder Monomethoxytrityl (Mmt) hergestellt wird.
- 20 38. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 oder 37, wobei die PNA unter Verwendung von festen Trägern hergestellt wird.
- 25 39. Verfahren nach Anspruch 38, wobei als fester Träger CPG, Tentagel oder Aminomethylpolystyren verwendet wird.
40. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, wobei
- 30 a) ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1-12 oder 15-22 hergestellt wird, und

- b) gegebenfalls mit weiteren pharmakologisch verträglichen Zusatz- und/oder Trägerstoffen versetzt wird.

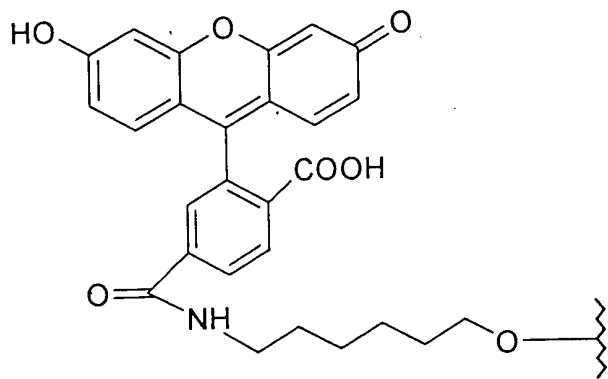
- 5 41. Verfahren zur Herstellung eines PNA-Chips, wobei ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 22 entweder zuerst hergestellt und dann auf einem festen Träger fixiert wird, oder das PNA-Derivat direkt auf dem Träger hergestellt wird.
- 10 42. Verfahren zur Herstellung eines PNA-Derivats der Formel I gemäß Anspruch 36 bis 39, ferner dadurch gekennzeichnet, dass die PNA unter Ausnutzung des sauren Charakters des Phosphorrestes mittels Chromatographie oder Elektrophorese aufgereinigt wird.
- 15 43. Verfahren nach Anspruch 42, wobei das PNA-Derivat durch Chromatographie mittels einer basischen stationären Phase und eines Gradienten eines sauren oder salzhaltigen Eluent gereinigt werden.
44. Verfahren nach Anspruch 43, wobei die stationäre Phase ein Anionenaustauscher oder eine Mixed-Mode-Phase ist.



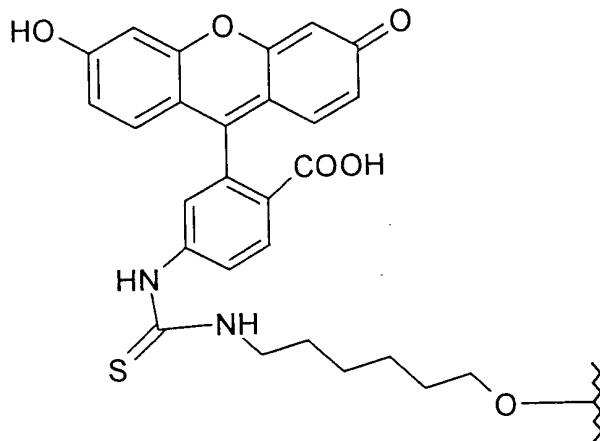
### Zusammenfassung:

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind PNA-Derivate, die am C-Terminus oder C-und N-Terminus des PNA-Rückgrates einen oder mehrere Phosphoryl-
- 5 Rest tragen, die gegebenenfalls eine oder mehrere Markergruppen, oder Gruppen zur Quervernetzung, oder Gruppen, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen, oder Gruppen, die die Bindungsaffinität des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigern, tragen. Gegenstand der Erfindung ist ferner ein
- Verfahren zur Herstellung der oben genannten PNA-Derivate und ihre
- 10 Anwendung als Arzneimittel oder Diagnostikum.

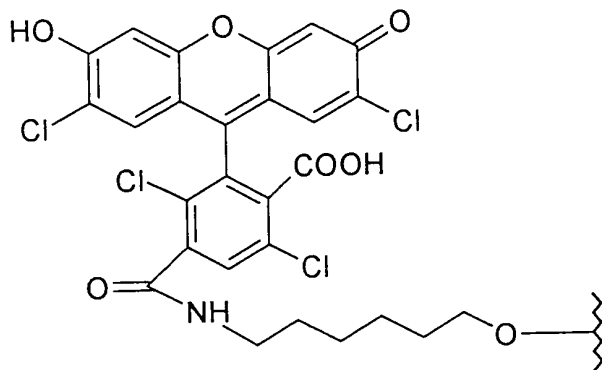
Figur 1a:



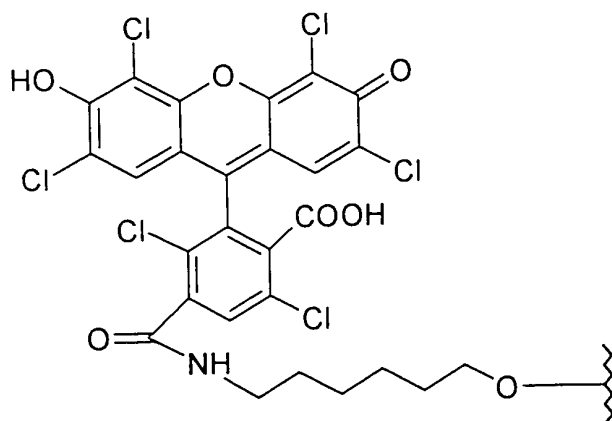
Fluorescein (Amid)



Fluorescein (Thioharnstoff)

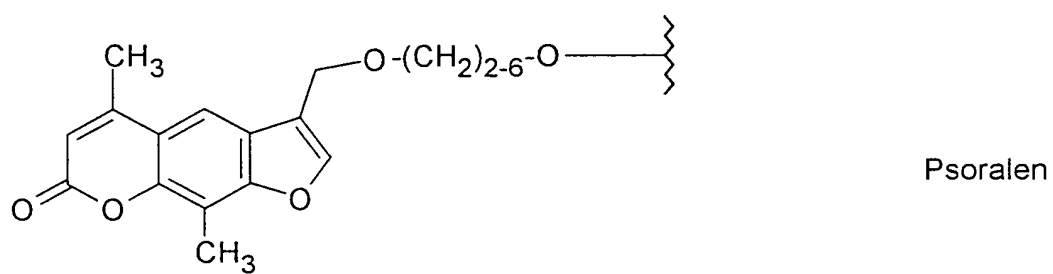
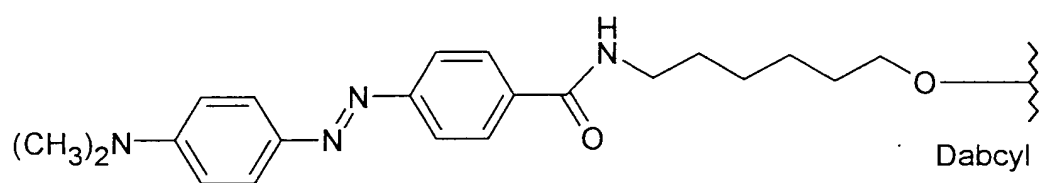
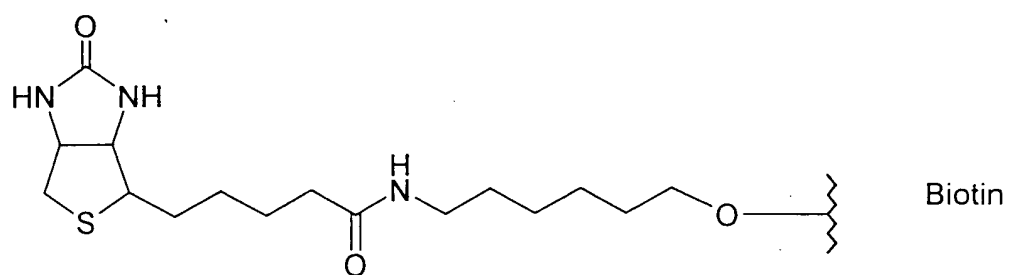


Tetrachlorofluorescein

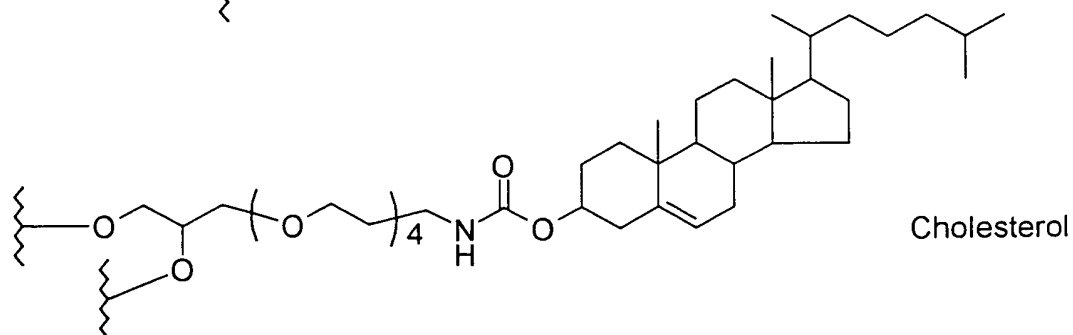
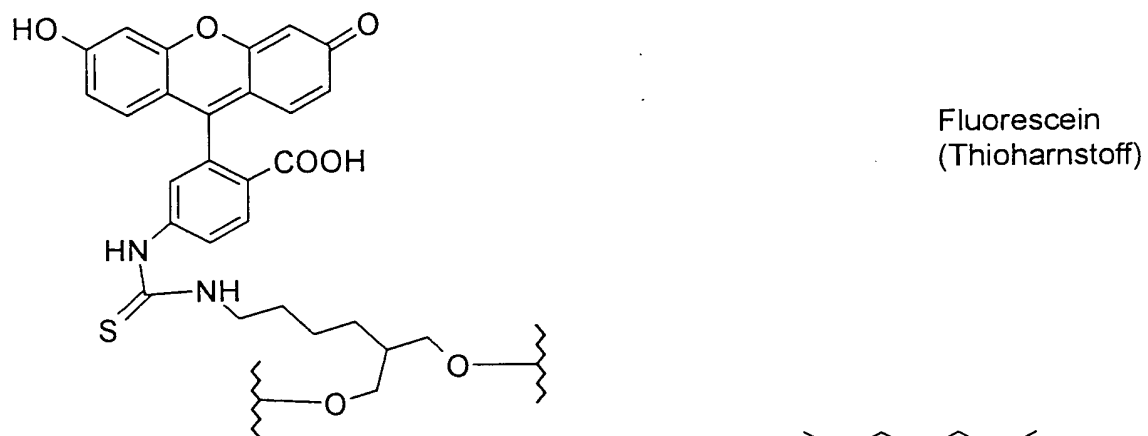
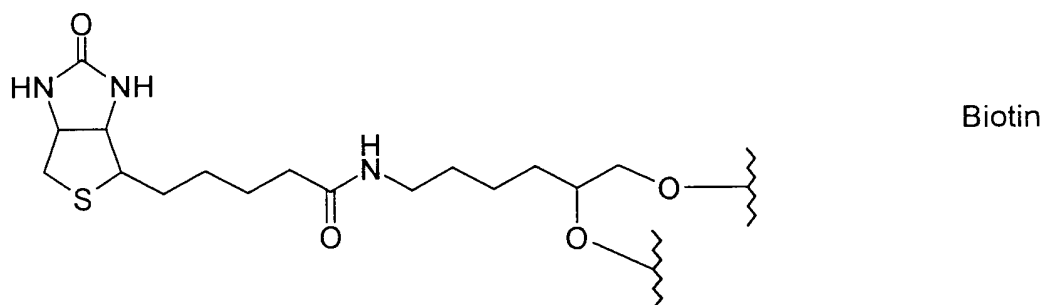
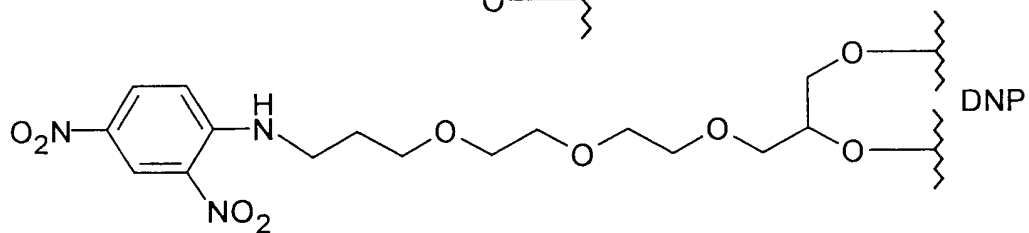
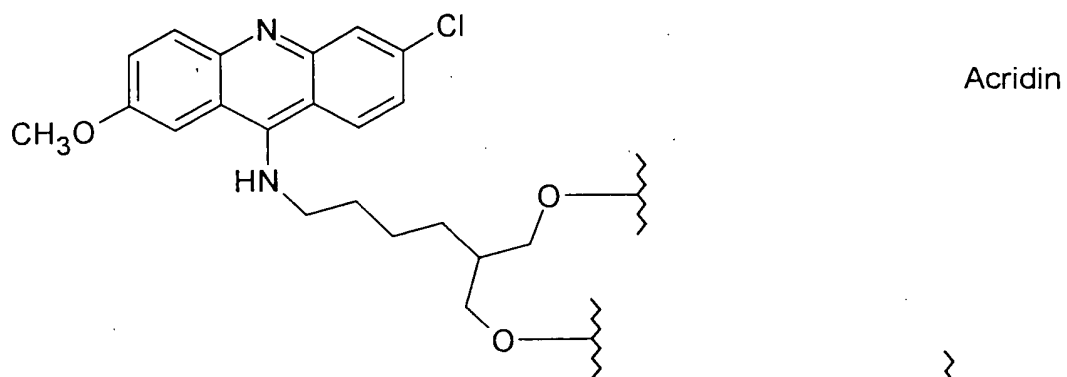


Hexachlorofluorescein

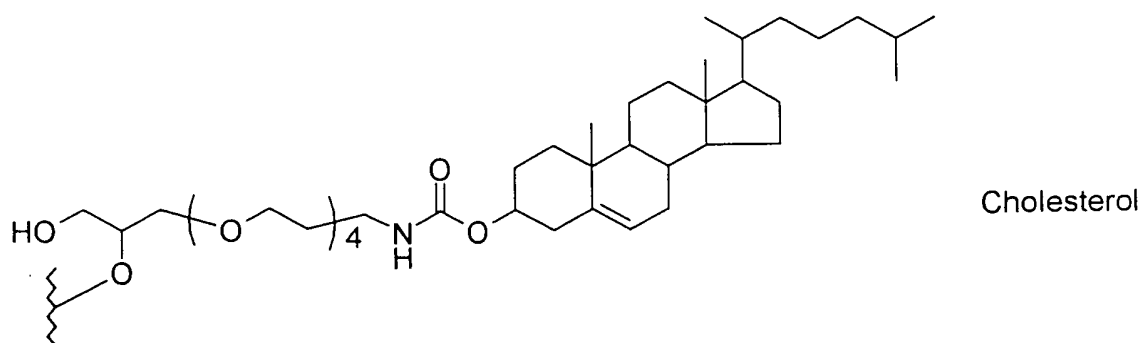
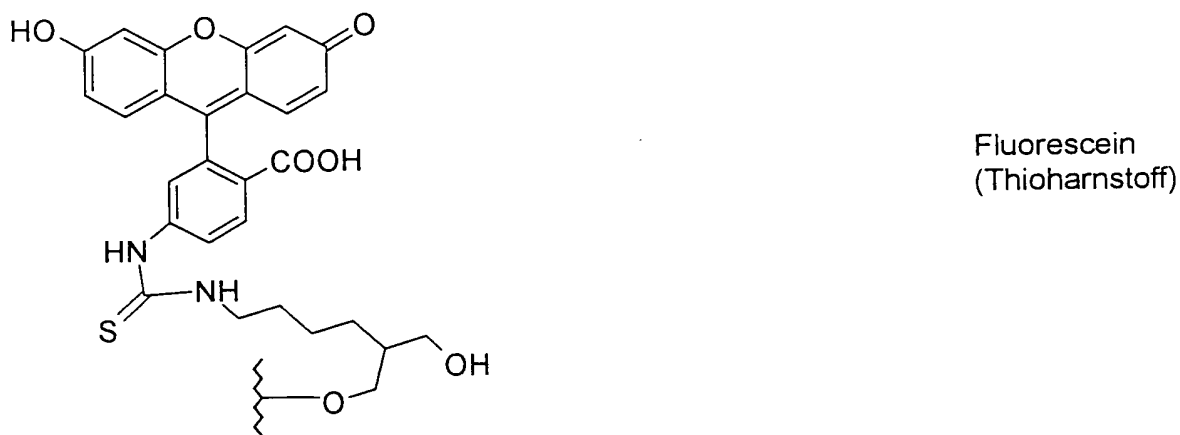
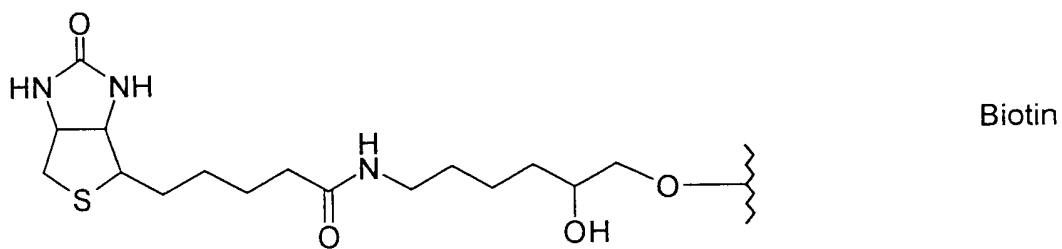
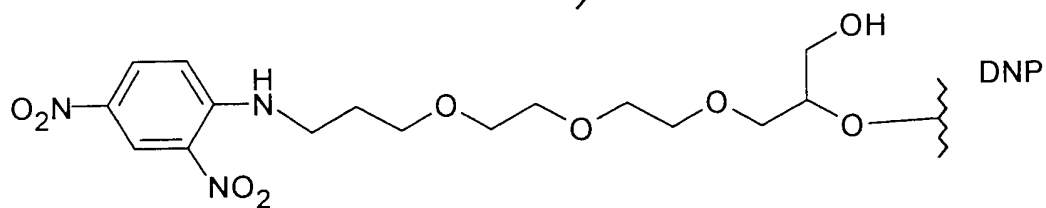
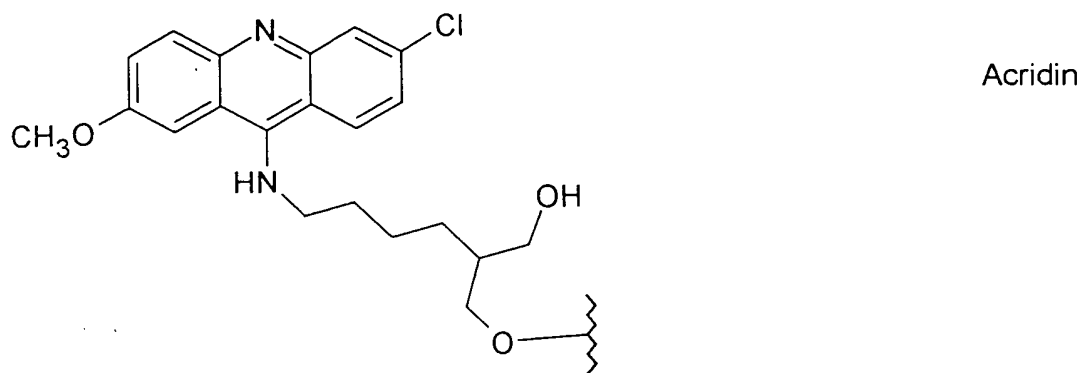
Figur 1b:



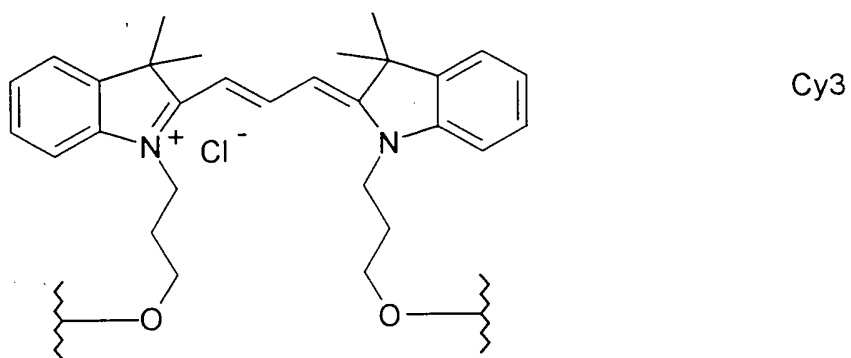
Figur 2a:



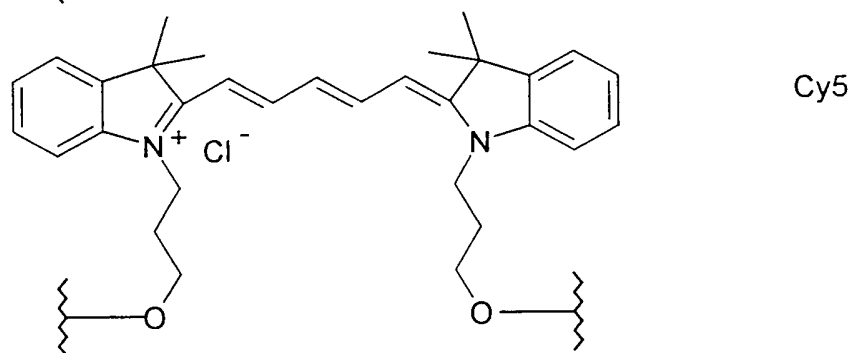
Figur 2b:



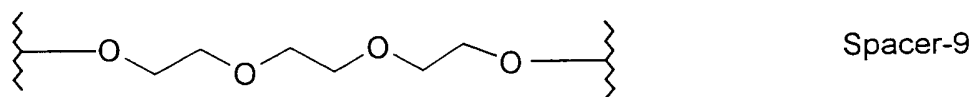
Figur 3a:



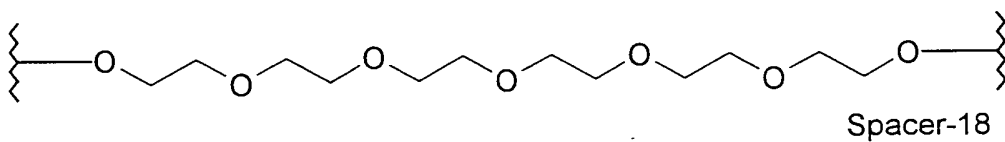
Cy3



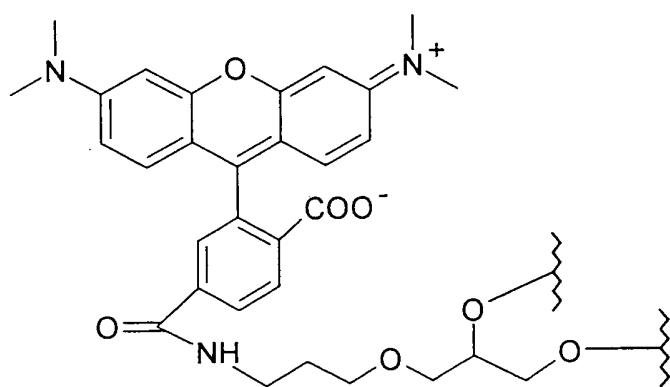
Cy5



Spacer-9

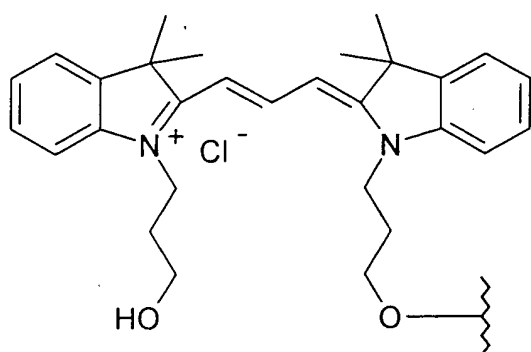


Spacer-18

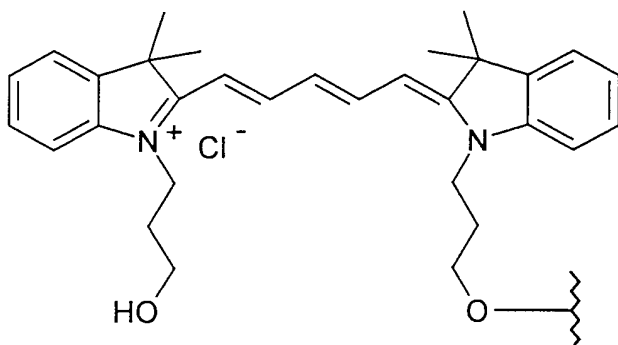


TAMRA

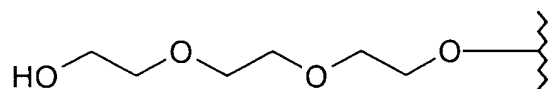
Figur 3b:



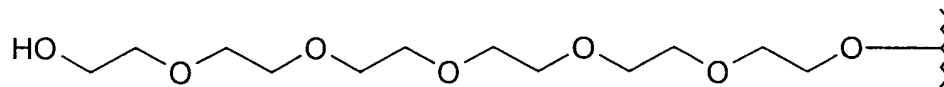
Cy3



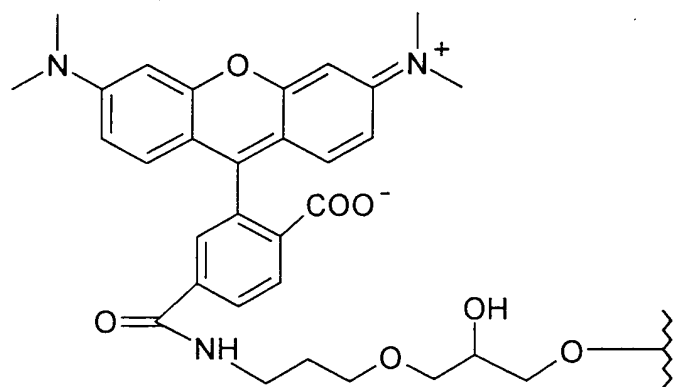
Cy5



Spacer-9

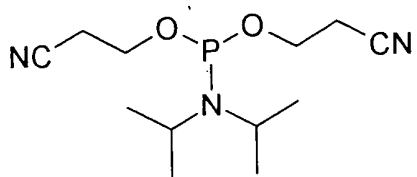


Spacer-18

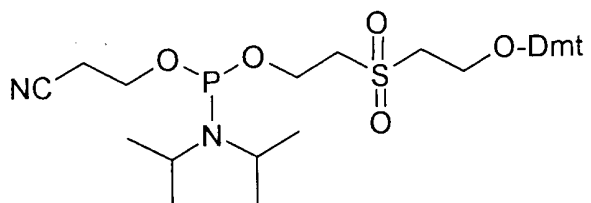


TAMRA

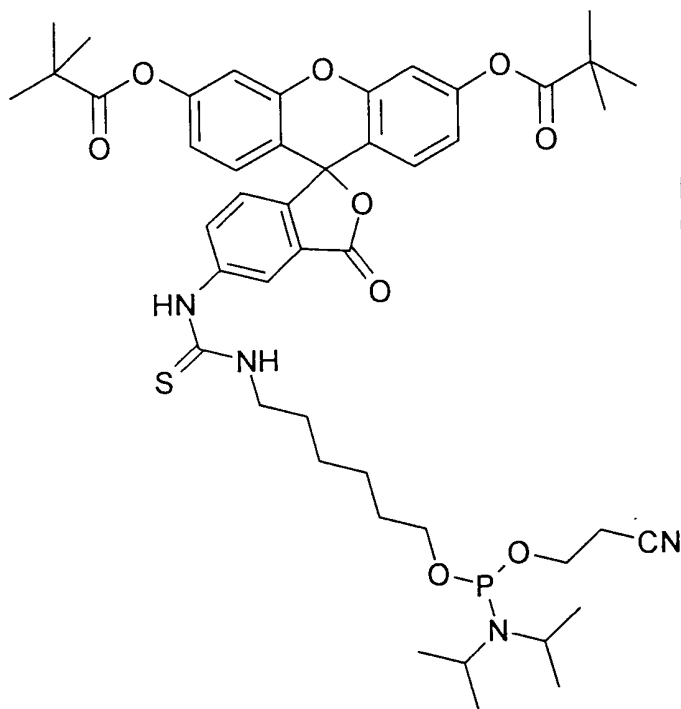
Figur 4a:



Phosphorylierungsreagenz 1



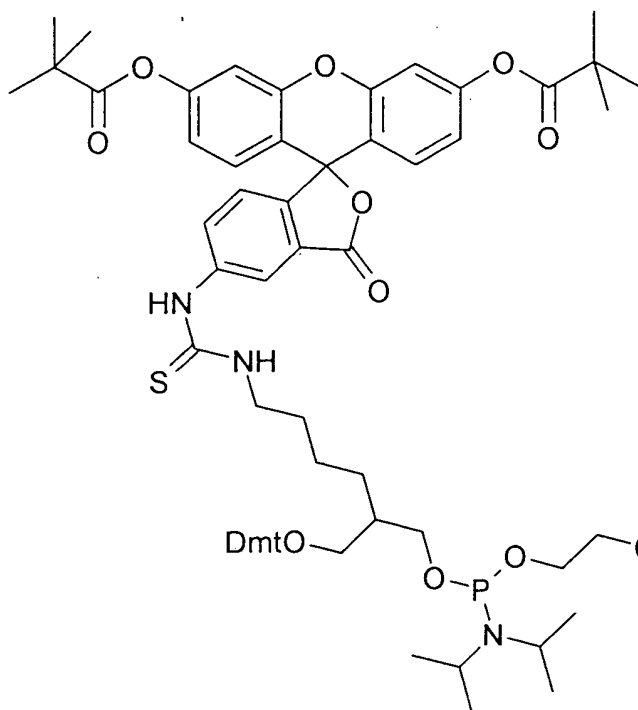
Phosphorylierungsreagenz 2



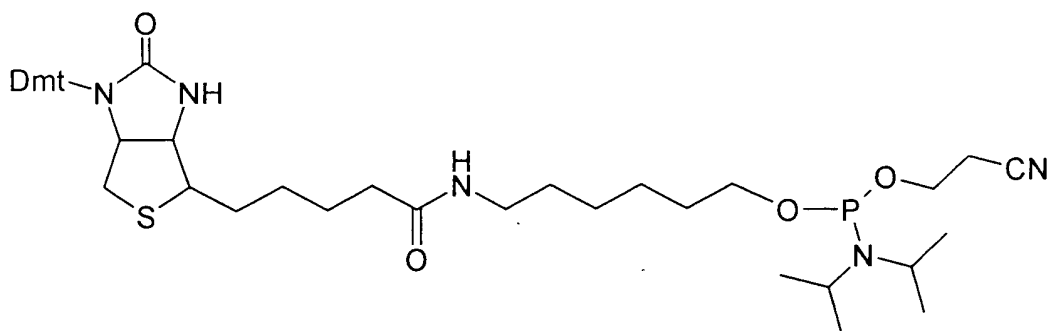
Fluorescein Phosphoramidit 3  
(monofunktionell)



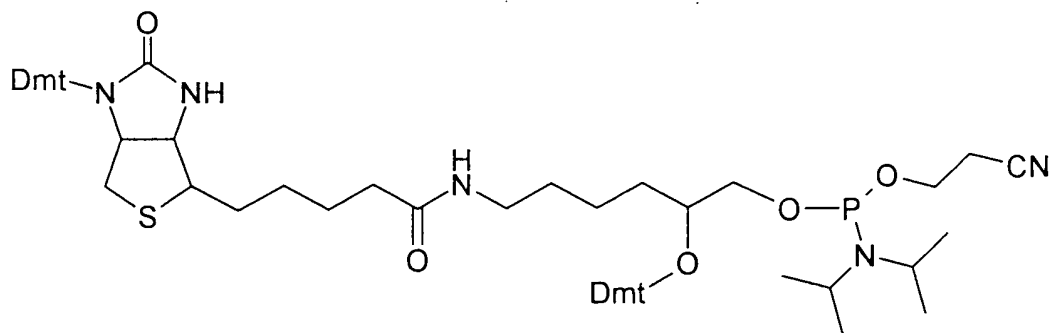
Figur 4b:



Fluorescein Phosphoramidit 4  
(bifunktionell)



Biotin Phosphoramidit 5 (monofunktionell)

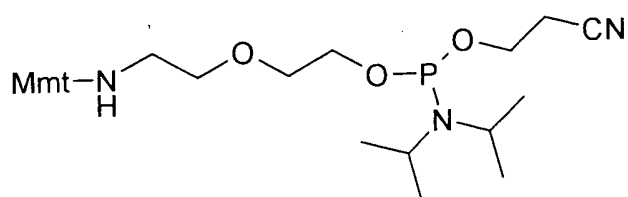


Biotin Phosphoramidit 6 (bifunktionell)

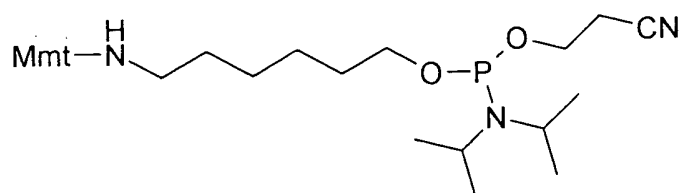
CCCCCCCCCCCCCCCCOP(=O)(N(C)C(C)C)OCC#N[illegible][illegible][illegible]

Cyanin-5 Phosphoramidit 11

Figur 4d:

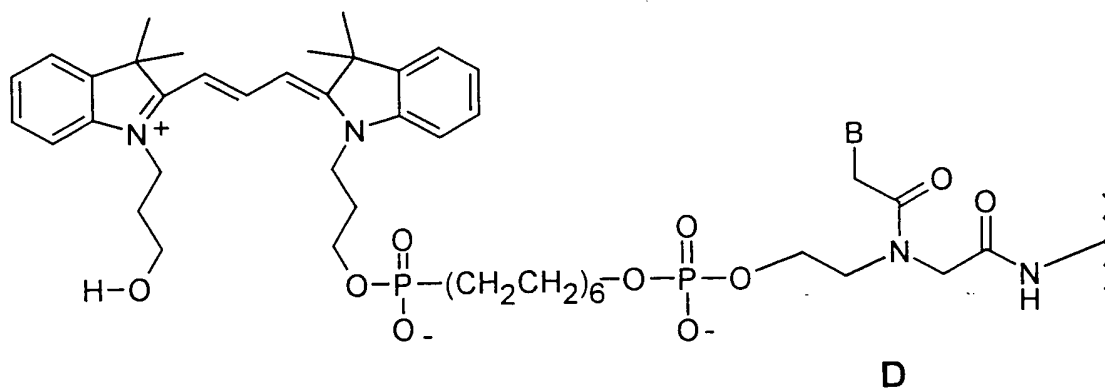
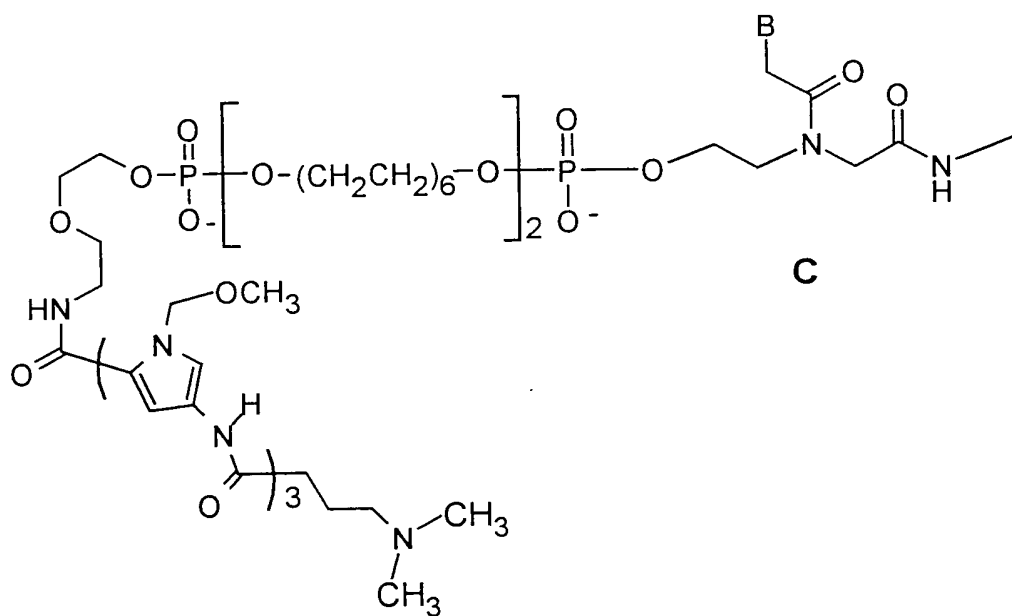
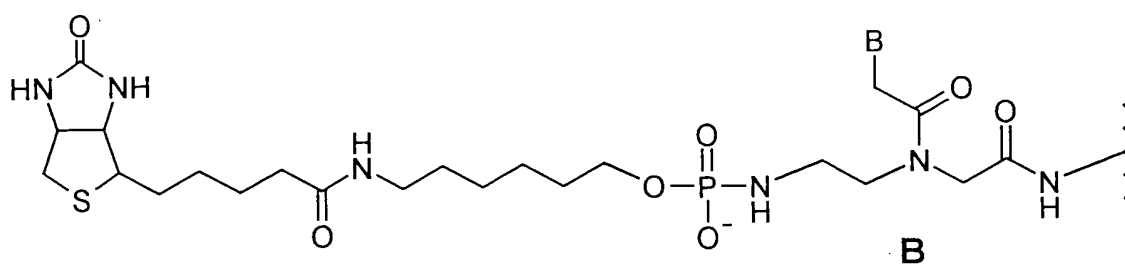
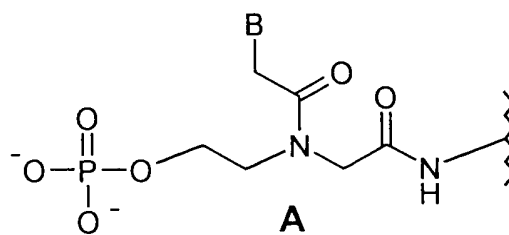


Aminomodifier-5  
Phosphoramidit 12

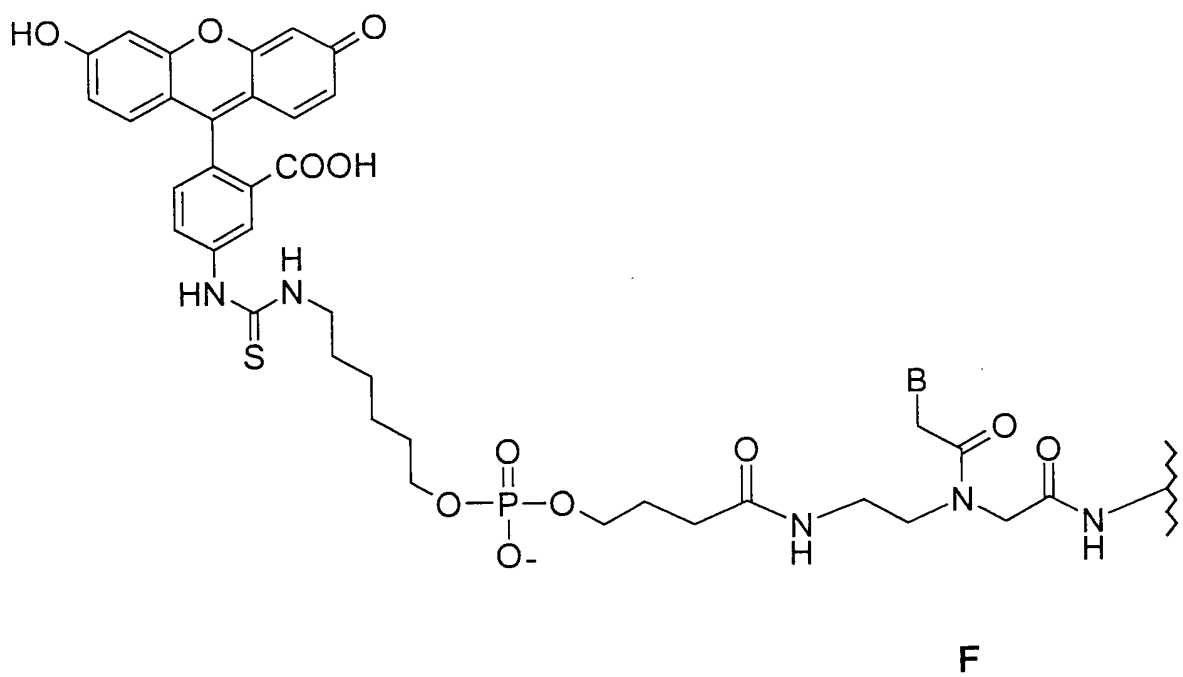
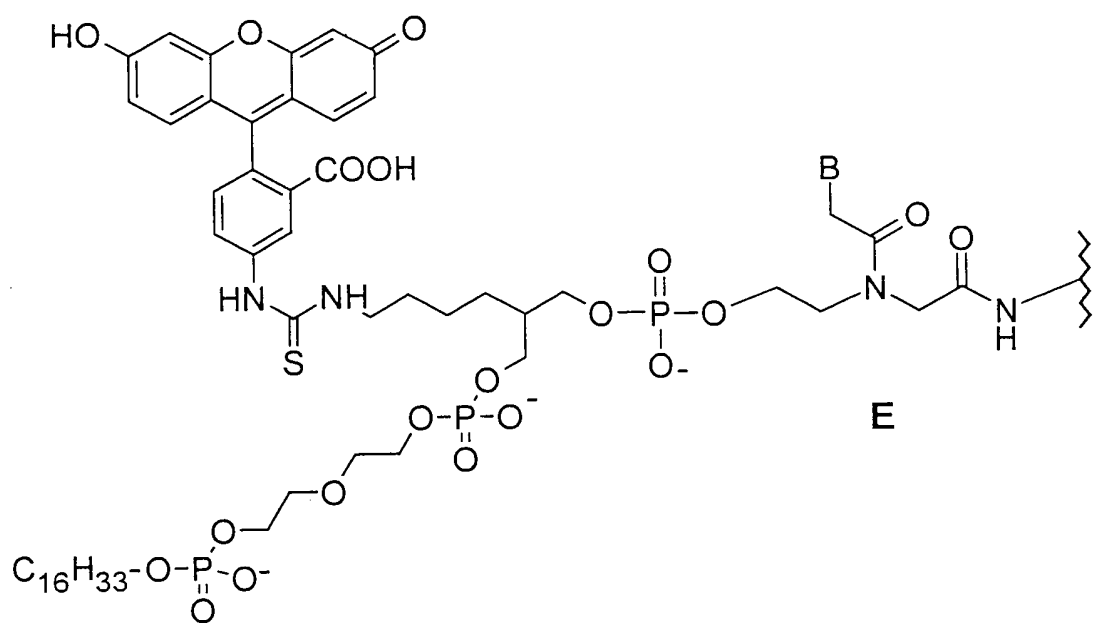


Aminomodifier-C6  
Phosphoramidit 13

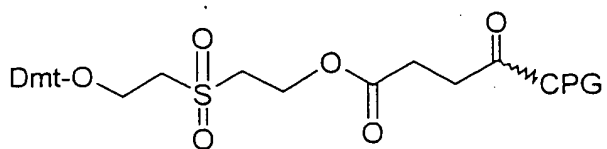
Figur 5a:



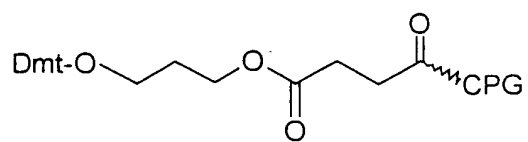
Figur 5b:



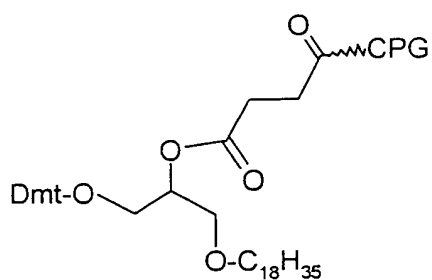
Figur 6:



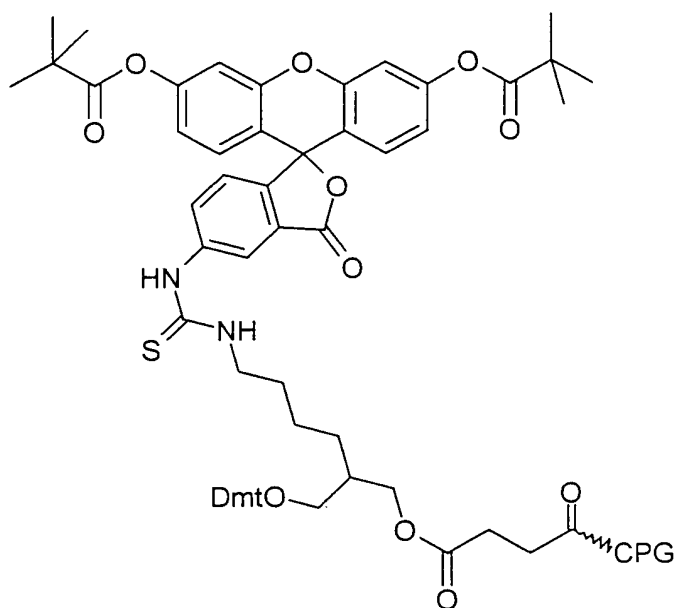
Bishydroxyethylsulfonyl Träger 1



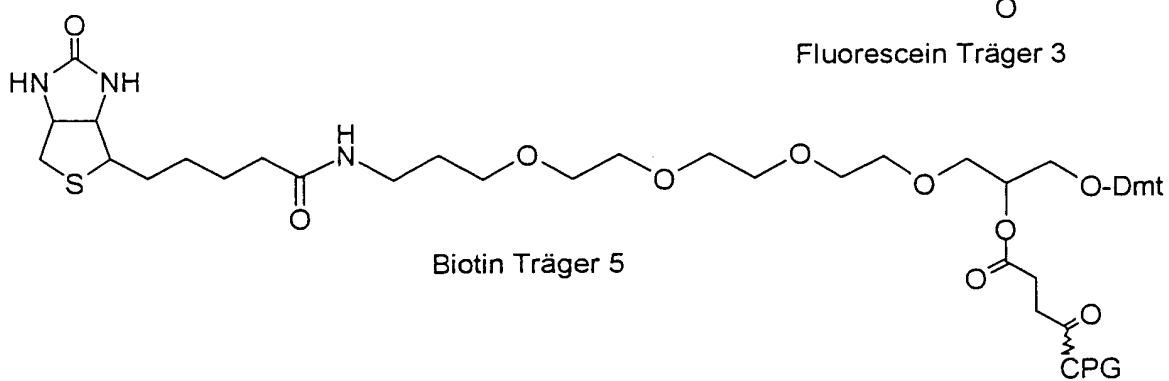
3'-Spacer-C3 Träger 2



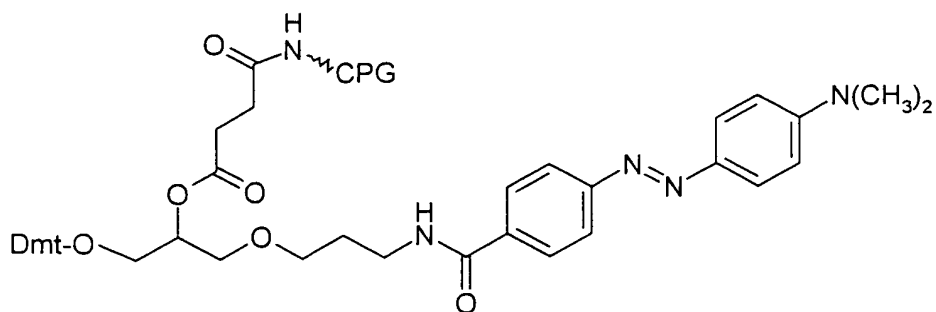
3'-Batyl Träger 4



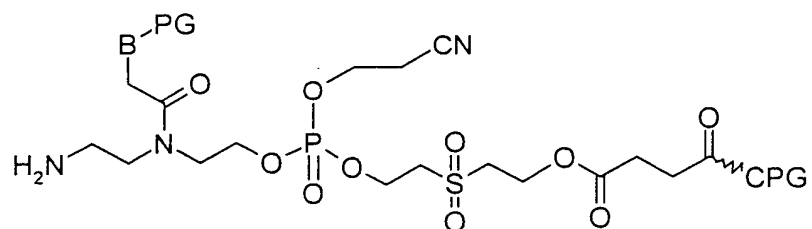
Fluorescein Träger 3



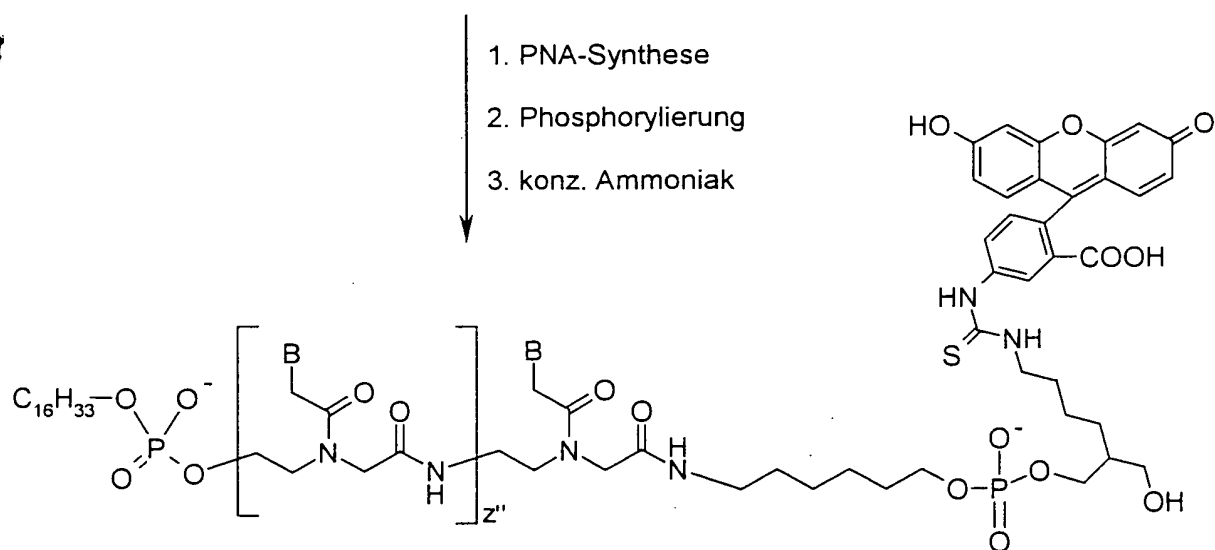
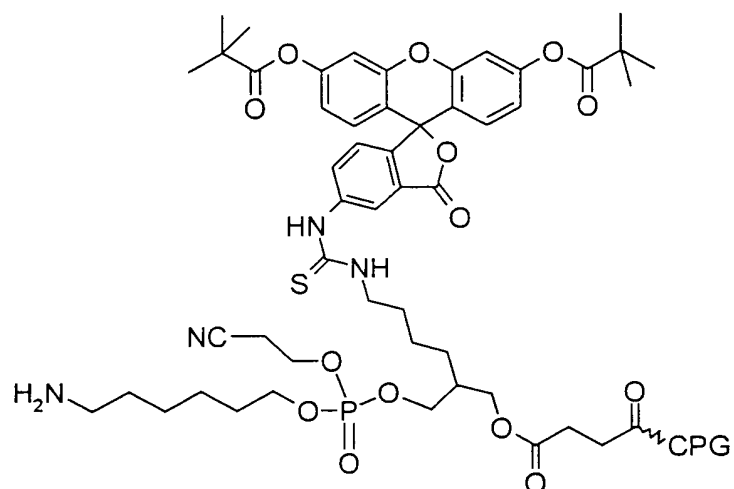
Biotin Träger 5



DABCYL Träger 6

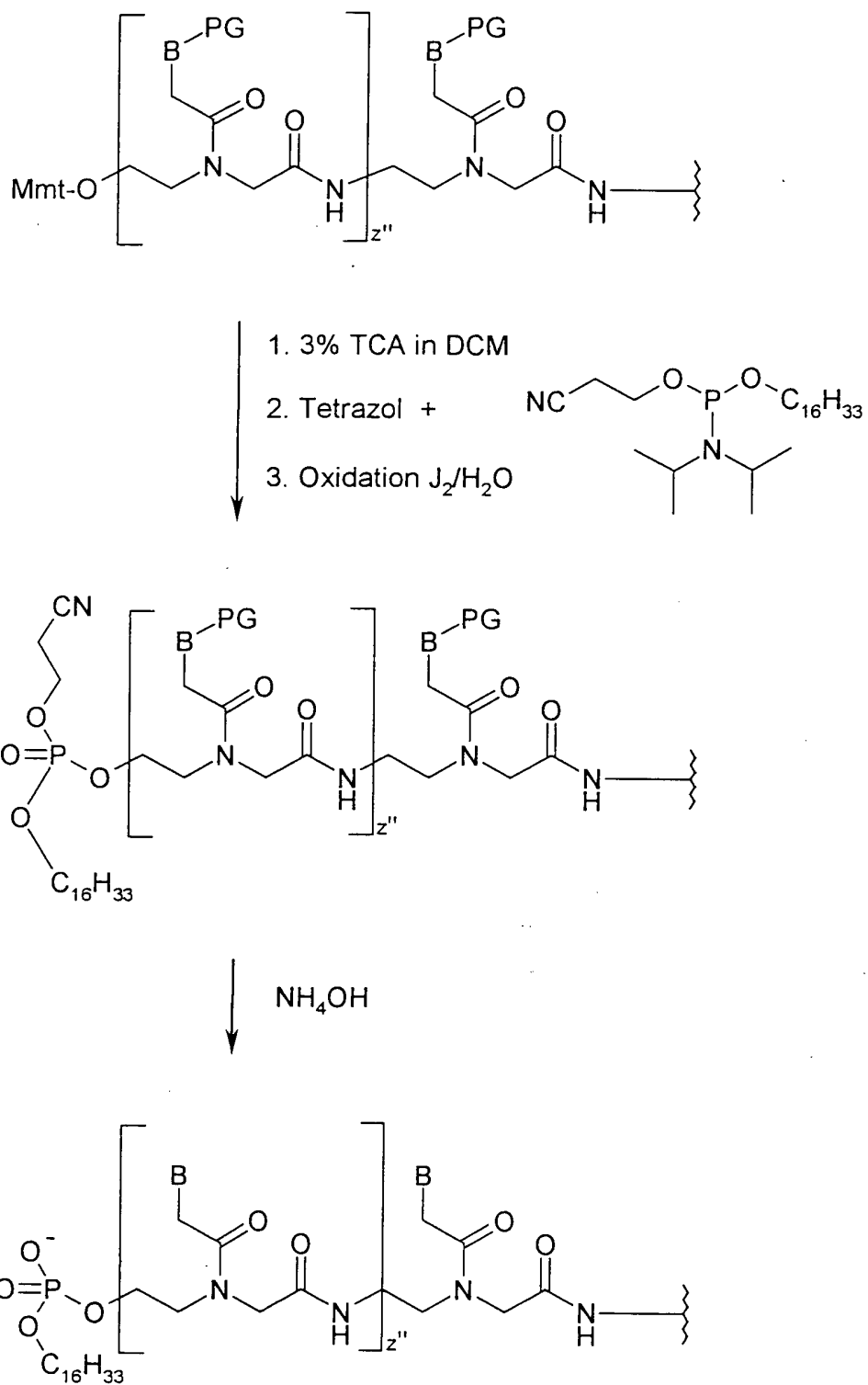
[illegible]
$$\text{Ac-NH} \left[ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COCH}_2\text{NHC(=O)CH}_2\text{B}) \right]_{z''} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COCH}_2\text{NHC(=O)CH}_2\text{B})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O-P(=O)}_3^-$$

1. Tetrazol +  
 2. Oxidation  $J_2/H_2O$   
 3. 3% TCA in DCM





Figur 9:





Creation date: 09-11-2003  
Indexing Officer: BTO2 - BAO-TRAN TO  
Team: OIPEBackFileIndexing  
Dossier: 09835371

Legal Date: 01-08-2002

No.	Doccode	Number of pages
1	LET.	3
2	OATH	2

Total number of pages: 5

Remarks:

Order of re-scan issued on .....